

9–1115.
ety. 2013. Vol. 29, N 48.

11, N 26. P. 1–12.
800–6807.

SPARTATE PARTICLES

hift of a maximum of ab-
tion with gold NP's. This
enters of mAspAT bind-
mAspAT with gold NP's
tely restored at increase
ived results it is possible
the electrostatic nature.

УДК 546.26+577.113

А. С. ЕГОРОВ¹, В. П. ЕГОРОВА², В. И. КРОТ³, Г. В. КРЫЛОВА³, Ф. Ф. ЛАХВИЧ⁴,
И. В. ЛИПНЕВИЧ⁴, Т. И. ОРЕХОВСКАЯ⁴, А. А. ВЕЛИГУРА², М. И. ГОВОРОВ¹,
Б. Г. ШУЛИЦКИЙ⁴, В. С. УЛАЩИК¹

ЭЛЕКТРОХИМИЧЕСКОЕ И ЭЛЕКТРОФОРЕТИЧЕСКОЕ ДЕТЕКТИРОВАНИЕ ГИБРИДИЗАЦИИ НА КОМПЛЕКСАХ ДНК/УГЛЕРОДНЫЕ НАНОТРУБКИ: SNP-ГЕНОТИПИРОВАНИЕ

¹Институт физиологии НАН Беларуси

²Белорусский государственный педагогический университет

³Белорусский государственный университет

⁴Белорусский государственный университет информатики и радиоэлектроники

⁵Белорусский государственный медицинский университет

(Поступила 23.07.2014)

В работе развивается одно из наиболее актуальных направлений анализа состояний ДНК-содержащих биохимических маркеров – регистрация изменений конформационного состояния однострочной (ss) ДНК после адгезии маркеров по изменению оптических, электрохимических свойств слоистых нанобиогетероструктур. Для этого в условиях самосборки синтезированы новые комплексы ssДНК с химически модифицированными малослойными углеродными нанотрубками (мУНТ) нековалентной функционализации. Комплексообразование происходит в процессе электронно-плотной компактификации ДНК на мУНТ. Эффекты УНТ-усиленной компактификации ДНК выявлены методами рамановской и диэлектрической спектроскопии, структурного анализа, гель-электрофореза. Предлагается использовать тонкие пленки из ssДНК/мУНТ-комплексов в качестве сенсорных бионаногетероструктур в емкостных датчиках. Представлены результаты использования этого нового метода генотипирования однонуклеотидного полиморфизма.

Введение. В настоящее время процедура секвенирования (расшифровки) генома человека стала не только возможной, но и доступной, хотя все еще дорогостоящей [1– 6]. Это делает перспективным развитие методов диагностики мутаций генома, накапливаемых за время жизни индивидуума. Хотя уровень мутаций на поколение низок, точечные мутации или однонуклеотидные замены (ОНП – однонуклеотидный полиморфизм; SNP – Single Nucleotide Polymorphism) являются часто встречающимися прижизненными вариациями генома (геном че-

УНТ имеет более высокие характеристики, чем олигонуклеотиды, особенно в отношении селективности, скорости и чувствительности

ловека из 25000 генов накапливает порядка 400 мутированных (частота встречаемости более 1 %) [7; 8]. Огромное количество SNP делает их генетическими маркерами для превентивной медицины [8]. Из более чем 10 миллионов выявленных в геноме человека точечных мутаций, несколько тысяч связано с индивидуальной предрасположенностью к заболеваниям, определенным биохимическим профилем, устойчивостью к воздействию окружающей среды (и, в частности, различных лекарственных препаратов) и т. д. [9].

Селективная сортировка нуклеотидов

Бионанодетектор изменений в ДНК (генотипирование однонуклеотидного полиморфизма) должен сочетать взаимоисключающие свойства. С одной стороны, олигонуклеотиды должны взаимодействовать с детекторными, высокочувствительными сайтами (т. е. несущими «репортерные» группы) более сильно, чем с неспецифическими молекулярными агентами, а с другой – образовывать специфический комплекс с ДНК-мишенями через слабые водородные связи. Значительная часть методов детекции SNP основана на использовании гибридационных флуоресцентных зондов (олигонуклеотидов с ковалентно связанными репортерными группами: флуоресцирующей и тушащей) [10–16]. Для методов с ковалентной привязкой «репортерных» групп неспецифический вклад в сигнал вносят как искажения конформации ДНК, так и наличие остаточной флуоресценции и неустойчивость к действию внутриклеточных нуклеаз [17]. Это приводит к частичной гибридизации [10–12; 18]. Использование наноструктурированных материалов: наночастиц с золотом, графена, углеродных нанотрубок (УНТ) и других повышает уровень сигнала, но неспецифический вклад все равно остается значительным [13; 14; 19; 20].

Уникальное свойство нуклеотидных оснований – стэкингообразно упорядочиваться на поверхности УНТ, которые, являясь графеноподобным материалом, характеризуются очень слабым рассеянием носителей заряда. Это делает возможным комплексообразование ДНК с УНТ и, соответственно, может быть использовано для решения проблем детектирования SNP [14; 21–29]. Олигонуклеотид с флуоресцеином (FAM – fluorescein phosphoramidites) на одном конце и тушащей флуоресценцию FAM химической группой (например, родамин или УНТ) на другом был предложен в качестве молекулярного сигнализатора (молекулярные «бакены» (molecular beacons)) в [30; 31]. FAM на УНТ используется для детектирования присутствия комплементарных олигонуклеотидов – праймеров полимеразных цепочечных реакций. Три ароматических кольца флуоресцеина из четырех лежат в плоскости, и соответственно, только три кольца могут участвовать в стэкинговом π - π -взаимодействии с поверхностью УНТ как тушителя флуоресценции. Производные флуоресцеина предлагают использовать для детектирования гибридизации однонитевых ДНК на поверхности УНТ с точностью до одной некомплементарной пары нуклеотидных оснований включительно [32].

Принцип детектирования заключается в фиксировании однонитевой ДНК в вытянутом раскрученном состоянии на поверхности одностенной или многостенной углеродной нанотрубки. Отсутствие петель, образованных неспецифи-

ческим спариванием флуоресцентно-метки ДНК взаимодействует с составом с определенной степенью спиральности.

Чтобы усилить сигнал флуорофором и УНТ, можно использовать длительно меченные флуоресцентные кольца как нанолазеры. При облучении, а при строго разделении, что тушение пикетами (ОУНТ) и от тушения флуоресценции ОУНТ (материал интенсивного усиленного свечения).

Сенсор [32], который флуорофор-концентраций УНТ процессов. Поэтому с ростом относительной эффективности использования флуорофоров в структуре, наличие свечения а от наличия в них меченной ДНК. Изучение нуклеотидов

В [33] указывают на то, что гатов олигонуклеотидов в электронно-плоскостной структуре, а также как побочный продукт.

Синтез ДНК-нанотрубок с карбоксильными группами на концах, количеством стенок, из путей решения проблемы Ленгмюра-Блоджетта, двумерные (2D) и одномерные (1D) танно поляризованы по «зигзаг»-УНТ.

их (частота встречаемости генетическими полиморфизмов выявлено связано с индивидуальными биохимическими особенностями (и, в частности,

однонуклеотидного полиморфизма). С одной стороны, полиморфизмы, высокочувствительные к воздействию флуоресцентного зонда – образуют прочные ковалентные связи. Значительный вклад в гибридную связь вносят ковалентно связанные нуклеотиды [16]. Для методов, основанных на использовании флуоресценции, вклад в сигнал от флуоресценции [17]. Это приводит к структурированию нанотрубок (УНТ) и, следовательно, все равно оста-

ется образно упорядоченным материалом, что делает возможным использование. Это делает возможным использование олигонуклеотидов на конце и туша-амина или УНТ) на поверхности (молекулярные структуры используются для детектирования полимеров полим-ресцеина из четырех могут участвовать в тушении флуорес-ценции для детектирования флуоресценции до одной [32]. Однонуклеотидной ДНК или много-нуклеотидных неспецифи-

ческим спариванием нуклеотидных оснований, с одновременным закреплением флуоресцентно-меченного конца однонуклеотидной ДНК на поверхности УНТ позволяет ДНК взаимодействовать с немеченной однонуклеотидной молекулой ДНК другого состава с образованием дуплекса, характеризующегося максимально высокой степенью спиральности двухнуклеотидной структуры.

Чтобы усилить стэкинг-π-π-взаимодействие между ароматическим флуорофором и УНТ, в работе [33] использовали олигодезоксирибонуклеотид, ковалентно меченный пиренильным флуоресцентным зондом, все четыре ароматических кольца которого, в отличие от FAM, находятся в одной плоскости. Пиренильный флуорофор высвечивает в области 480–500 нм при ультрафиолетовом облучении, а производные флуоресцеина – в области 505–550 нм. Это позволило строго разделить флуоресцентные вклады двух типов флуорофоров. Оказалось, что тушение пиренильного флуорофора одностенными углеродными нанотрубками (ОУНТ) имеет место во всем диапазоне концентраций ОУНТ в отличие от тушения флуоресцеина. В области низких концентраций флуоресцеин-меченных ОУНТ (менее 50 мг/л), увеличение их концентрации приводит к возрастанию интенсивности свечения остатков флуоресцеина. Механизм этого УНТ-усиленного свечения флуоресцеина не выяснен.

Сенсор [32], основанный на явлении УНТ-зависимого тушения флуоресценции флуорофор-меченной однонуклеотидной ДНК, функционирует в области низких концентраций УНТ для минимизации вносимых искажений гибридационных процессов. Поэтому имеющее место УНТ-зависимое усиление флуоресценции с ростом относительно малого числа молекул УНТ делает проблематичным эффективность использования таких сенсоров. Кроме того, интеркалирование флуорофоров в структуру ДНК влияет на степень гидратации ДНК [34]. Интенсивность свечения ассоциатов флуоресцентно-меченной однонуклеотидной ДНК зависит от наличия в них воды, так как молекулы связанной воды гасят флуоресценцию меченной ДНК. Исследование влияния УНТ на гидратационное тушение свечения нуклеотидов также не проводилось.

В [33] указывалось на возможность самоорганизации пиренильных конъюгатов олигонуклеотидов на поверхности одностенных УНТ как «сворачивание» в электронно-плотную наноструктуру. В этом случае самосборка рассматривалась как побочный эффект, препятствующий молекулярному узнаванию.

Синтез ДНК-содержащих нанобиогетероструктур на основе малодисперсных карбоксилированных синтетических углеродных нанотрубок с небольшим количеством стенок (слоев) (мУНТ) в процессе самосборки может быть одним из путей решения проблемы SNP-генотипирования [21–25; 28; 29]. Нанотехнология Ленгмюра–Блоджетт (ЛБ) позволяет сформировать высокоупорядоченные двумерные (2D) кластеры функционализированных УНТ, которые могут спонтанно поляризоваться в силу локализации заряда, баллистически движущегося по «зигзаг»–УНТ [35; 36].

Установление закономерностей комплексификации малостенных УНТ с ДНК в кластерах и зависимости природы детектируемого сигнала от ее характеристик позволило бы разработать нанобиотехнологию для генотипирования SNP. В данной работе исследуются самоорганизованные комплексы мУНТ/ДНК, способные к кооперативному связыванию с комплементарными олигонуклеотидными последовательностями.

Цель работы – установить условия высокоэффективного зарядового транспорта и дальнего (резонансного) переноса энергии в наноструктурных комплексах малостенных углеродных нанотрубок с ДНК для реализации эффективной сенсорики ДНК-основанных процессов на поверхности УНТ для генотипирования однонуклеотидных замен.

Материалы и методы исследования. Реагенты. Одноцепочечные олигодезоксирибонуклеотиды (праймерные последовательности ssДНК), использованные для проведения исследований, синтезированы на ООО «Праймтех» (Минск, Беларусь) (табл. 1).

Таблица 1. Названия и характеристики олигонуклеотидов

Название олигонуклеотида	Последовательность и тип олигонуклеотида
FAM-ON1	5'-FAM-GCCATATACTCTCCTTGGTGACA-3' (FAM-меченный)
ON1	5'-GCCATATACTCTCCTTGGTGACA-3' (немеченный)
ON2	5'-TGTCACCAAGGAGAGTATATGGC-3' (ON1-комплементарная целевая последовательность)
ON5	5'-TGTCACCAAGGCGAGTATATGGC-3' (ON1-целевая последовательность с одним SNP)
ON3	5'-TGTTACCAAGGCGAGTATAGGGC-3' (ON1-целевая последовательность с тремя SNP)
ON4	5'-GTAGGCTTGGGAATAGTACGA-3' (ON1-некомплементарная целевая последовательность)

Также в качестве нуклеотидных последовательностей использовалась высокоочищенная плацентарная ДНК в концентрации 1,03 мг/мл в буфере 10^{-5} M Na_2CO_3 , содержание РНК и белка $<0,1$ % (отношение оптических плотностей $D_{160} / D_{230} = 2,378$ и $D_{160} / D_{280} = 1,866$ соответственно). Для определения молекулярной массы олигонуклеотидов использовался «ДНК маркер молекулярного веса, 1Kb» (Праймтех, Беларусь), окрашиваемый красителем Zabr Green I (Праймтех, Беларусь).

Максимум поглощения FAM – 495 нм, максимум флуоресценции – 525 нм [32; 33]. Максимум поглощения Zabr Green I – 497 нм, максимум флуоресценции – 520 нм [37]. Флуоресценция Zabr Green I на порядок возрастает при интеркаливании между парами азотистых оснований, когда молекулы флуорофора по-

падают в неполярном окружении в несвязанном состоянии.

Для функционализации нанотрубок использовался тидилхолин L-α-Ph.

Нефункционализированные нанотрубки химического парового синтеза гидрофобизировали с помощью гидрофобизирующих группами [38].

Дифильный олигонуклеотид (ON1) с последовательностью 5'-GCCATATACTCTCCTTGGTGACA-3' (концентрация $1,0 \cdot 10^{-3}$ M).

Все остальные олигонуклеотиды (ON2, ON3, ON4, ON5) использовались в качестве комплементарных или некомплементарных к ON1.

Гель-электрофорез проводился в 4% полиакриламидной гелевой матрице.

Углеродные нанотрубки (400 до 600 мг) в 40 мл 0,1 M TBE буфера (рН 8) подвергались ультразвуковой обработке в течение 1 часа. Концентрация FAM-ON1 на поверхности нанотрубок ($c = 0,5$ пикоМол/мл) определялась в ТЕ-буфере при комнатной температуре и электрофорез проводился в TBE буфере (рН 8) при напряжении 200 В (электрических пар) по мощности, осушенному (GE Healthcare Bio-Science) в течение 3 раз.

Спектральный анализ проводился в видимом диапазоне спектра с помощью спектрометра при возбуждении и излучении нуклеотида определяли при 260 нм, на спектре комплексов FAM-ON1-мУНТ после (ультрафиолетового) на длине волны 50 нм на системе ImageC в наборе электрохимических растворов Zabr Green I в растворе Tris-HCl; 1 мМол/л.

Электрохимические измерения проводились в щтыревая структу

енных УНТ с ДНК
т ее характеристик
ования SNP. В дан-
Т/ДНК, способные
клеотидными по-

зарядового транс-
курных комплек-
ции эффективной
для генотипирова-

мечные олигодез-
), использованные
х» (Минск, Бела-

идов

леотида

3'

льность)

NP)

NP)

тельность)

льзовалась вы-
з буфере 10^{-5} М
ких плотностей
целения молеку-
молекулярного
Green I (Прайм-

нции – 525 нм
луоресценции –
при интеркали-
луорофора по-

падают в неполярное окружение. Напротив, свечение FAM активируется при его нахождении в несвязанном состоянии.

Для функционализации мУНТ использовались стеариновая кислота и фосфатидилхолин L- α -Phosphatidylcholine (Sigma, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, 99 %).

Нефункционализированные углеродные нанотрубки формировались методом химического парового осаждения (CVD). Затем эти углеродные нанотрубки гидрофилизировались ковалентной модификацией их поверхности карбоксильными группами [38; 39].

Дифильный олигомер производных тиафена (дитионилпиррол, HDTP): 3-гексадецил-2,5-ди(тиофен-2-ил)-1H-пиррол [40–42] растворяли в гексане в концентрации $1,0 \cdot 10^{-3}$ М.

Все остальные используемые вещества были класса химически чистых аналитических реактивов.

Гель-электрофорез. В электрофоретических исследованиях использовалась суспензия углеродных нанотрубок, полученная диспергированием мУНТ (от 400 до 600 мг) в 400 мл ТЕ буфера (концентрация мУНТ $c_{\text{мУНТ}} = 1; 1,5; 10$ мг/мл) ультразвуковой обработкой (22 кГц, 10 мин). Для проведения комплексиции FAM-ON1 на мУНТ к 13,5 мкл олигонуклеотида FAM-ON1 в ТЕ буфере ($c = 0,5$ пикоМол/мкл) добавили 100 мкл суспензии нанотрубок различной концентрации в ТЕ-буфере. Реакционную смесь выдерживали в кювете при комнатной температуре или обрабатывали ультразвуком в течение от 1 до 10 мин. Гель-электрофорез проводили в полиакриламидном геле (ПААГ) в 0,5-кратном 0,09 М TBE буфере (pH 8,0) при комнатной температуре в течение 45 мин. Контроль электрических параметров электрофоретической системы, переустанавливаемых по мощности, осуществлялся на аппаратуре Electrophoresis Power Supply EPS 601 (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Швеция). Гель-электрофорез повторялся не менее 3 раз.

Спектральный анализ. Спектральные исследования в ультрафиолетовом и видимом диапазоне проводились с использованием конфокального макрорама-новского спектрометра Nanofinder HE (LOTIS-TII, Япония–Беларусь) при лазерном возбуждении на длинах волн 473 и 532 нм. Исходную концентрацию олигонуклеотида определяли по оптической плотности водного раствора, измеренной при 260 нм, на спектрофотометре SOLAR RV-2201 (Беларусь). Эффективность комплексиции оценивали по интенсивности флуоресценции смеси FAM-ON1–мУНТ после облучения ультрафиолетовым светом на длине волны 302 нм (ультрафиолетовое возбуждение) с детектированием излучения красителей на длине волны 500 нм с последующим просмотром и документированием гелей на системе ImageQuant 300 (GE Healthcare, США). Предварительно ДНК-маркер в наборе электрофоретических проб окрашивали помещением этого набора в раствор Zubr Green I в течение 2 мин, затем отмывали в ТЕ буфере (10 мМоль Трис-HCl; 1 мМоль ЭДТА, pH 8,0).

Электрохимические измерения. В качестве датчика использовалась встречно-штыревая структура из i пар электродов, $i = 1, \dots, N$, расположенных на ситал-

ловой подложке [43–45]. Каждая пара электродов представляла собой электрическую ёмкость открытого типа. Изоляторный слой электродов создавался двухстадийным анодированием и представлял собой бездефектный пористый оксид алюминия с диаметром пор 10 нм [46]. Все электрохимические измерения проводились с использованием деионизированной, бидистиллированной воды.

Формирование пленок Ленгмюра–Блоджетт. Формирование мономолекулярных слоев (монослоев) и получение пленок по ЛБ-методу осуществлялось при температуре субфазы $-17 \pm 0,5$ °C на автоматизированной установке с контролем осаждения на подложки и с компьютерным интерфейсом. Контроль поверхностного натяжения осуществлялся высокочувствительным резонансным индукционным датчиком. Для получения мономолекулярных слоев раствор дитионилпиррола наносился с помощью микропипетки на поверхность жидкой субфазы, представляющей собой раствор соли трехвалентного железа в бидистиллированной воде. Далее монослой выдерживался в течение 10 мин для испарения растворителя, после чего сжимался подвижным барьером до формирования монослоя Ленгмюра в кристаллическом состоянии с посадочной площадкой $66 \pm 1,45$ Å²/молекула.

Для получения монослоев из мУНТ, нековалентно функционализированных стеариновой кислотой или фосфолипидом, спиртовой раствор смешивали с раствором стеариновой кислоты или фосфолипида в гексане. Полученную смесь гомогенизировали до образования мицелл жирных кислот с мУНТ внутри [35]. Затем гомогенизат выкапывали на поверхность ЛБ-ванны. Монослои Ленгмюра–Блоджетт с комплексами олигонуклеотид/мУНТ формировали аналогичным образом.

Сжатие монослоя дитионилпиррола проводилось со скоростью 4 мм/мин. Скорость сжатия монослоя из мУНТ или смеси олигонуклеотида с мУНТ – 2,3 мм/мин. Коэффициент переноса принимает значения около 1,0 для первого монослоя. Все сформированные монослои выдерживали в течение 5 мин для перехода в равновесное состояние и переносили при постоянном поверхностном давлении 29,0 мН/м на поверхность подложки путем опускания и вынимания вертикально ориентированной пластинки сквозь монослой в субфазу (нанесение Y-типа). Подложки с нанесенной ЛБ-пленкой сушились при температуре 20 °C в течение 24 ч.

Визуализация и дифракция. Электронограммы и микродифракция исследуемых образцов получены на просвечивающем электронном микроскопе (ПЭМ) JEM-100CX (JEOL, Япония) ТЕМ при ускоряющем напряжении 100 кВ. Объекты электронно-микроскопических исследований предварительно наносились на медные сеточки с формваровым полимерным покрытием (поливинилформаль, приготовленный из 0,1–0,2 % раствора формвара в дихлорэтане).

Структурный и дифракционный анализ. Распределение мУНТ в ТЕ буфере после ультразвуковой обработки показано на рис. 1. Как видно из этого рисунка, за время ультразвуковой обработки (10 мин, 22 кГц) мУНТ равномерно распределяются по объему, и гибкие тонкие УНТ (диаметр d) геликоидально закручиваются с шагом спирали $\sim 1/d$.

Морфология ЛБ-мог функционализированн показана на рис. 2. Со диаметр используемых рьируется от 2,5 до 20 мУНТ имеют открыты

Распределение ssДН в ТЕ буфере после ульт зано на рис. 3, 4. Ком структуру типа кабел: рого является проводя жухом») – слой самоор тида темного цвета. Со ярко белое с резко оч сокую плотность оли Стэкинговое взаимодей к поверхности УНТ шаг спирали увеличи «кожухе» происходит только олигонуклеоти ствует об их рыхлости

После нековалентн карбоксилированные и высокоориентирован



50 нм

Рис. 2. ПЭМ монослоя мУНТ–стеаринованных дистиллированной поверхности в $\text{Ce}_2(\text{SO}_4)_3(6)$ или ONI–мУ

ла собой электриче-
тов создавался двух-
ный пористый оксид
ие измерения прово-
анной воды.

ование мономолеку-
осуществлялось при
тановке с контролем
онтроль поверхност-
онансным индукци-
раствор дитионил-
ть жидкой субфазы,
бидистиллированной
рения растворителя,
и монослоя Ленгмю-
 $\pm 1,45 \text{ \AA}^2/\text{молекула}$.
ционализированных
смешивали с раство-
ченную смесь гомо-
Г внутри [35]. Затем
ои Ленгмюра–Блод-
логичным образом.
оростью 4 мм/мин.
леотида с МУНТ –
оло 1,0 для первого
течение 5 мин для
ном поверхностном
ания и вынимания
субфазу (нанесение
температуре 20 °C

ифракция исследу-
микроскопе (ПЭМ)
нии 100 кВ. Объек-
льно наносились на
поливинилформаль,
не).

е МУНТ в ТЕ буфе-
видно из этого ри-
МУНТ равномерно
геликоидально за-

Морфология ЛБ-монослоев с МУНТ, нековалентно
функционализированными стеариновой кислотой,
показана на рис. 2. Согласно ПЭМ-изображениям,
диаметр используемых углеродных нанотрубок ва-
рьируется от 2,5 до 20 нм, длина – от 0,5 до 2,5 мкм.
МУНТ имеют открытые концы (рис. 2, а).

Распределение ssДНК-олигонуклеотид (ON1)/МУНТ
в ТЕ буфере после ультразвуковой обработки пока-
зано на рис. 3, 4. Комплексы ssДНК/МУНТ имеют
структуру типа кабеля (рис. 3), сердцевинкой кото-
рого является проводящая МУНТ, а оболочкой («ко-
жухом») – слой самоорганизованного олигонуклео-
тида темного цвета. Собственно изображение УНТ –
ярко белое с резко очерченным темным краем. Темный цвет указывает на вы-
сокую плотность олигонуклеотида, самоорганизованного на поверхности УНТ.
Стэкинг-взаимодействие уменьшает поляризацию УНТ в трансверсальном
к поверхности УНТ направлении (спонтанную поляризацию), вследствие чего
шаг спирали увеличивается (рис. 3, б). На самоорганизованном нуклеотидном
«кожухе» происходит эпитаксиальный рост отросткообразных кристаллитов
только олигонуклеотида (рис. 4). Блекло-белый цвет кристаллитов свидетель-
ствует об их рыхлости и, соответственно, неплотной молекулярной упаковке.

После нековалентной функционализации молекулами стеариновой кислоты
карбоксилированные углеродные нанотрубки формируют высокоупорядоченные
и высокоориентированные ЛБ–УНТ-кластеры в процессе эпитаксиального роста

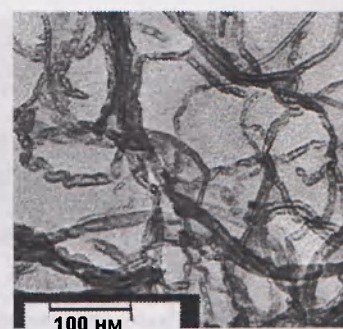


Рис. 1. ПЭМ-изображение МУНТ
в ТЕ-буфере

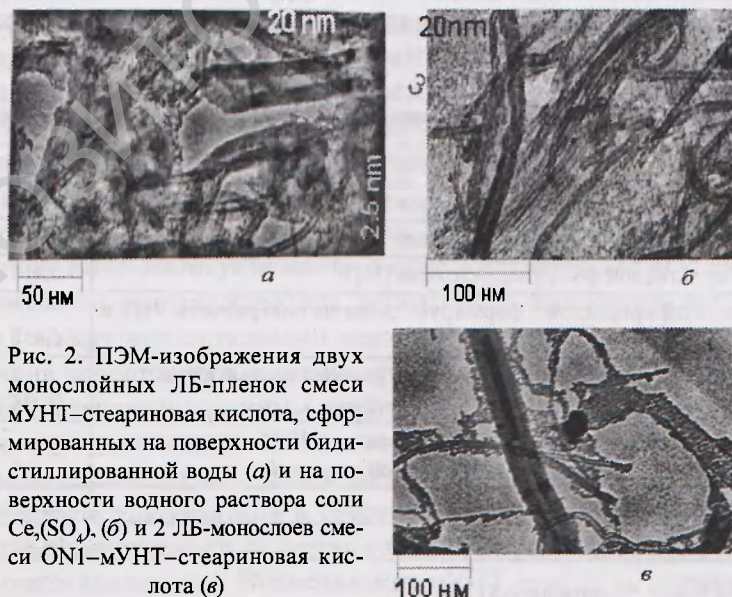


Рис. 2. ПЭМ-изображения двух
монослойных ЛБ-пленок смеси
МУНТ–стеариновая кислота, сфор-
мированных на поверхности биди-
стиллированной воды (а) и на по-
верхности водного раствора соли
 $\text{Ce}_2(\text{SO}_4)_3$ (б) и 2 ЛБ-монослоев сме-
си ON1–МУНТ–стеариновая кис-
лота (в)



Рис. 3. ПЭМ-изображения комплексов ssДНК/мУНТ в ТЕ-буфере. Области электронно-плотного олигонуклеотида указаны стрелками

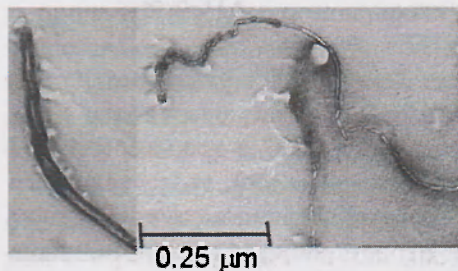


Рис. 4. ПЭМ-изображение отростков – кристаллитов свободного олигонуклеотида, эпитакиально выросших на комплексах ssДНК/мУНТ в ТЕ-буфере

на кристаллических железосодержащих ЛБ-пленках олигомера пиррол-тиофенового ряда [35]. Параметры дифрактограмм ЛБ-УНТ-кластеров на ЛБ-пленках дитионилпиррола представлены в табл. 2. Кроме того, дифрактограммы ЛБ-УНТ-кластеров на поверхности сетки, модифицированной дитионилпирроловой ЛБ-пленкой, также характеризуются линиями Кикучи [35]. Электронограммы с линиями Кикучи получаются от совершенных монокристаллов с большим размером блоков ($5 \cdot 10^{-7}$ – 10^{-6} см) и малой разориентацией [47–49]. Поэтому

расположенные на ЛБ-пленках дитионилпиррола ЛБ-кластеры карбоксилированных и нековалентно функционализированных стеариновой кислотой мУНТ представляют собой монокристаллиты.

Таблица 2. Межплоскостные расстояния в высокоупорядоченном ЛБ-массиве УНТ

Фаза	d_p , нм	$2d_u$, нм
5 кристаллических Fe-содержащих монослоев HDTP	0,682	–
3-монослойная ЛБ-пленка фосфатидилхолина	0,384	–
Ламеллярный мультислой фосфатидилхолина [51]	0,411	–
Олигонуклеотидный кристаллит, формирующийся на поверхности УНТ в ЛБ-пленке	0,438	–
2 монослоя смеси мУНТ–стеариновая кислота, расположенные на Fe-содержащей ЛБ-пленке HDTP (ЛБ–УНТ-кластер)	0,236	0,512
мУНТ в ЛБ-пленке, сформированной сжатием смеси мУНТ–олигонуклеотид ON1 с фосфатидилхолином или стеариновой кислотой	–	0,614
Гексагональный графит* 2H (вюрцит)	0,255	0,6706
Гексагональный чаоит* (кратерный углерод)	0,224	0,563

Примечание: * – каталог ASTM.

На дитионилпирроловых ЛБ-пленках также формируются наиболее высокоупорядоченные ЛБ-монослои из смеси мУНТ–стеариновая кислота. Параметры, представленные в табл. 1. Дифрактограмма (лауэграмма) ssДНК/мУНТ имеет максимумы в нулевом узле дифракционной решетки. Класс симметрии – $2D_{10}$ типа лауэграммы. На рис. 2, в видно, что комплексы ON1/мУНТ представляют собой мУНТ, покрытые упакованным слоем олигонуклеотида, толщина нуклеотидного слоя составляет 10 нм. Расстояние между линиями УНТ при добавлении ssДНК (см. табл. 2).

В отличие от лауэграммы, зированные стеариновой кислотой смеси ON1–нековалентно функционализированных молекул фосфолипидов $\sim 0,38$ нм, что соответствует кристаллической форме независимо от вида.

На основании данных можно предположить, что

ПААГ-электрофлуоресценция FAM
Для однонитевого олигонуклеотида Zubr Green I между олигонуклеотидами наблюдается флуоресценция олигонуклеотида при возбуждении FAM, экситонным переносом.

Оценим присутствие олигонуклеотида в электрофоретическом геле, предварительно озвученной олигонуклеотидной массой высветленного FAM-олигонуклеотида.

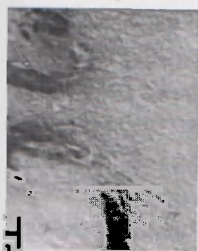


Рис. 6. Электронно-плотного

железосодержащих пиррол-тиофеновых дифрактограмм ЛБ-пленках дитионны в табл. 2. Кроме ЛБ-УНТ-кластеров модифицированной 5-пленкой, также хак Кикучи [35]. Электронными Кикучи полукристаллов (5 · 10⁻⁷–10⁻⁶ см) [47–49]. Поэтому карбоксилатной кислотой МУНТ

м ЛБ-массиве УНТ

d_p , нм	$2d_p$, нм
0,682	–
0,384	–
0,411	–
0,438	–
0,236	0,512
–	0,614
0,255	0,6706
0,224	0,563

На дитионилпирроловых ЛБ-пленках также формируются наиболее высокоупорядоченные ЛБ-монослои из смеси ON1–МУНТ–стеариновая кислота с параметрами, представленными в табл. 1. Дифракционная картина (лауэграмма) комплексов ssДНК/МУНТ имеет три рефлекса в нулевом узле обратной решетки. Класс симметрии такого типа лауэграмм – C_2 [47–50]. На рис. 2, в видно, что ЛБ-комплексы ON1/МУНТ представляют собой МУНТ, покрытые плотноупакованным слоем молекул олигонуклеотида, толщина l_{st} нуклеотидного слоя – от 2 до 10 нм. Расстояние между стенками УНТ при добавлении олигонуклеотидных слоев возрастает с 0,512 до 0,614 нм (см. табл. 2).

В отличие от лауэграмм ЛБ-пленок смеси ON1–нековалентно функционализированные стеариновой кислотой МУНТ, рефлексы на лауэграммах ЛБ-пленок смеси ON1–нековалентно функционализированные фосфолипидом МУНТ расположены радиально. Это обусловлено неоднородностью покрытия из разнородных молекул фосфолипида, причем межплоскостное расстояние в ЛБ-монослое фосфолипида ~0,384 нм. ЛБ-комплексы МУНТ с олигонуклеотидом в монокристаллической форме характеризуются межплоскостным расстоянием 0,438 нм независимо от вида нековалентной функционализации.

На основании дифракто- и электронограмм структура ssДНК/МУНТ комплекса может быть представлена в виде рис. 5.

ПААГ-электрофоретический анализ. Эффект УНТ-зависимого тушения флуоресценции FAM-олигонуклеотида с использованием ПААГ-электрофореза. Для одонитевого олигонуклеотида вероятность интеркалирования молекул Zabr Green I между нуклеотидными основаниями пренебрежимо мала. Поэтому флуоресценция одонитевого олигонуклеотида в геле обусловлена только высвечиванием FAM, экстрадированным наружу.

Оценим присутствие несвязанного (свободного) FAM-олигонуклеотида в электрофоретических пробах смеси МУНТ и FAM-олигонуклеотида, предварительно озвученной ультразвуком в течение 1 мин. Как видно на рис. 6, молекулярная масса высвечиваемого вещества совпадает с молекулярной массой свободного FAM-олигонуклеотида. Высвечивание МУНТ (рис. 6, а, дорожка 10) и ком-

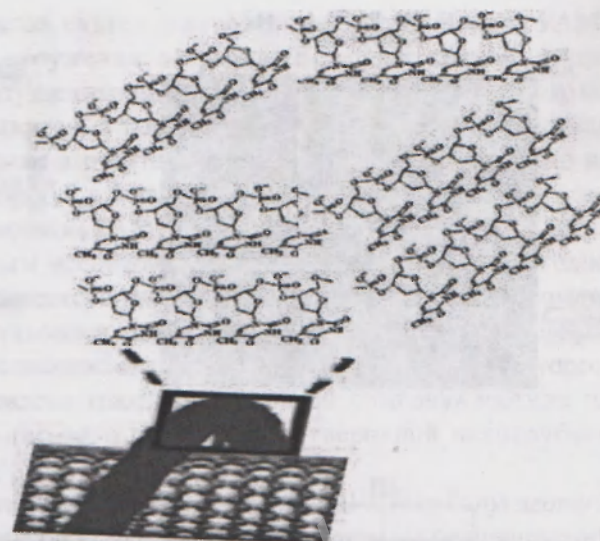
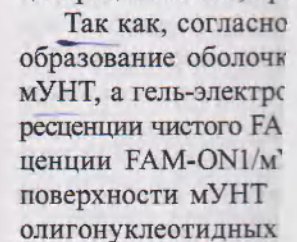


Рис. 5. Модель самоорганизованных комплексов одонитевого олигонуклеотида с УНТ

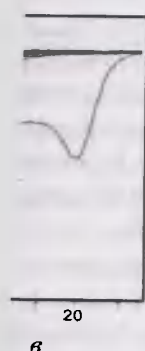
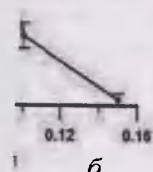


где q – электрический заряд, D – коэффициент диффузии, $T_{m, \text{отн}}$ – температура $T_{m, \text{отн}}$ э.

где T_m , I_m , W_m , m = электрофореза соотнесены в табл. 3, представленных на рис. 7, до концентрации возрастания и молекул FAM-ON и отдельных олигонуклеотидов флукутаций.

[illegible]

Нами также установлен эффект тушения флуоресценции FAM в гидратированных олигонуклеотидных ассоциатах. Концентрация свободного FAM-ON1 в электрофоретических пробах с МУНТ уменьшается за счет комплексообразования. С уменьшением концентрации свободного FAM-ON1 вероятность образования



б
К-маркер, 2 – FAM-ON1; 0,04; 0,06; 0,08; 0,1; интенсивности флуоресценции электрофоретических проб 3, 4 соответственно. ах (м. н.)

огласно рис. 6, б, электрофоретических проб с различным содержанием FAM-ON1 в полиакриламидном геле. Действие между

AM в гидратированном FAM-ON1 комплексом образуются

ния олигонуклеотидных ассоциатов падает, а вероятность выталкивания FAM-флуорофора из нуклеотидного окружения возрастает. Соответственно, число экстрадированных наружу, непотушенных флуоресцентных FAM-меток возрастает. Число нуклеотидных ассоциатов, в которых флуоресценция FAM гасится связанной водой, становится больше в отсутствие МУНТ. Поэтому (как видно из сравнения электрофоретических проб 2 и 3 на рис. 6) можно подобрать такую концентрацию МУНТ, при которой свечение FAM больше, чем в отсутствие МУНТ.

Так как, согласно структурным исследованиям, термодинамически выгодно образование оболочки кристаллического олигонуклеотида толщиной l_{st} вокруг МУНТ, а гель-электрофорезом установлен концентрационный тип тушения флуоресценции чистого FAM-ON1, то вышеописанное МУНТ-зависимое тушение флуоресценции FAM-ON1/МУНТ обусловлено плотной упаковкой олигонуклеотида на поверхности МУНТ за счет стэкинг-притяжения углеродной нанотрубки олигонуклеотидных оснований.

Температурные эффекты при комплексообразовании МУНТ/олигонуклеотид. Влияние температуры на комплексообразование оценивалось в предположении обратной пропорциональной зависимости ионной проводимости раствора от температуры T по аналогии с электропроводностью σ твердых тел [53]:

$$\sigma = q^2 N k / (D T), \quad (1)$$

где q – электрический заряд иона; k – скорость реакции иона с противоионом; D – коэффициент диффузии; N – ионная плотность. Используя (1), относительная температура $T_{m,отн}$ электрофореза рассчитывалась по формуле

$$T_{m,отн} = \frac{T_m}{T_1} = \frac{W_m I_1^2}{W_1 I_m^2},$$

где T_m , I_m , W_m , $m = 1, 2, 3$ – температура, электрический ток и мощность m -го электрофореза соответственно. Три электрофореза, параметры которых приведены в табл. 3, представлены кривыми с символами «●», «■» и «♦» на рис. 7 для относительных температур $\{T_{m,отн}\} = \{0,59; 1; 1,26\}$ соответственно. Как видно из рис. 7, до концентраций $c_{МУНТ} \sim 0,08$ мг/мл включительно, увеличение T приводит к возрастанию интенсивности I свечения и, соответственно, числа свободных молекул FAM-ON1. Это обусловлено уменьшением вероятности π - π -связывания отдельного олигонуклеотида с МУНТ с увеличением T из-за роста интенсивности флуктуаций.

Таблица 3. Параметры электрофореза в зависимости от относительной температуры при напряжении 100 В

I_m , мА	W_m , Вт	T_m/T_1
19,1	2	1
30,5	3	0,59
17,0	2	1,26

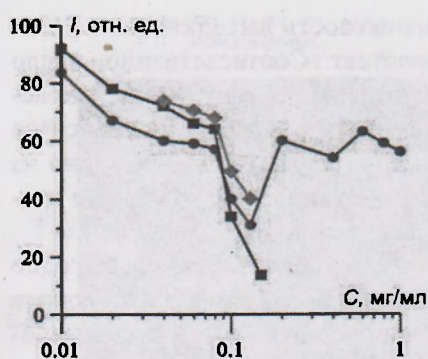


Рис. 7. Зависимости интенсивности I свечения FAM-ON1 от концентрации $c_{\text{мУНТ}}$. Линиями с символами «●», «■» и «♦» обозначены зависимости для относительных температур 0,59; 1 и 1,26 соответственно

При высоких концентрациях $c_{\text{мУНТ}} \sim 0,1$ и $0,15$ мг/мл, когда молекулы FAM-ON1 начинают взаимодействовать между собой, понижение относительной температуры от 1 до 0,59, наоборот, приводит к возрастанию I , поскольку малая диффузионная подвижность FAM-ON1 препятствует быстрой релаксации комплекса мУНТ/ON1 к равновесному состоянию с минимумом свободной энергии посредством минимизации межчастичного ориентационного взаимодействия в олигонуклеотидном покрытии, вследствие чего часть молекул FAM-ON1 не успевают связаться с мУНТ. Вместе с тем очень большие температуры также нежелательны при высоких $c_{\text{мУНТ}}$, поскольку они нарушают равновесное состояние с минимумом свободной энергии.

Ослабление эффекта УНТ-зависимого тушения свечения FAM-олигонуклеотида в ПААГ-электрофоретических пробах при высоких концентрациях мУНТ: При концентрации $c_{\text{мУНТ}} \sim 0,15$ мг/мл и при фиксированном значении концентрации c_{FAM} (FAM-ON1) среднее число свободных молекул олигонуклеотида, не связанных с углеродными нанотрубками, уменьшается практически до нуля с образованием комплекса мУНТ/ON1 (см. кривую с символами «■» на рис. 7). Однако, согласно рис. 7 (кривая с символами «●»), эффективное тушение FAM-флуоресценции в смеси мУНТ с ON1 имеет место не при всех концентрациях олигонуклеотида ($c_{\text{мУНТ}} \geq 0,15$ мг/мл), а только при некоторых оптимальных толщинах олигонуклеотидного покрытия $l_{st(1)}, l_{st(2)}, l_{st(3)}$ углеродной трубки, соответствующих $c_{\text{мУНТ}} \sim 0,15; 0,4; 0,9$ мг/мл. Это свидетельствует о существовании дискретного набора размеров комплекса мУНТ/ON1 с термодинамически устойчивой структурой.

Нестабильность олигонуклеотидного покрытия, формируемого на мУНТ и имеющего толщину $l_{nst(i)}$ между устойчивыми значениями $l_{st(i)}$ и $l_{st(i+1)}$, является причиной ослабления тушения FAM-флуоресценции посредством мУНТ. Например, содержание свободного FAM-ON1 в полиакриламидном геле не понижается для концентрации мУНТ 0,2 мг/мл, а, наоборот, возрастает относительно концентрации мУНТ 0,15 мг/мл (см. кривую с символами «●» на рис. 7). Дальнейшее повышение концентрации мУНТ и, соответственно, увеличение толщины ON1-покрытия приводит к такому размеру мУНТ/ON1-комплекса, что он снова приобретает стабильность.

Итак, существует критическая толщина олигонуклеотидного покрытия $l_{st(i)} < l_{ct(i)} < l_{nst(i)}$, при которой структура нанокомпозита мУНТ/ON1 становится термодинамически неустойчивой и распадается. Структура мУНТ/ON1 оказывается

неустойчивой при конце на размерами символов) свечения от концентрации в виде подслоя конечно взаимодействия. Так как дается мУНТ-зависимое трации $\sim 0,15$ мг/мл, то (n_{max}) олигонуклеотидных подболочки (подслои) друг за другом с образом

Ультразвуковое возм. 1,0 мг/мл) и времени УЗ-ресценции уменьшается свечения свободного FAM-флуоресценции под действием звуковой радиации, которую усиливается, но и чаше них монослоев олигонуклеотида, более 5 мин для конца FAM-флуоресценции в концентрации мУНТ олигонуклеотида, слабомассы под действием ультрафонового покрытия не становится l_{qust} . «Отшелушив» FAM-ON1. Если этого чивого нуклеотидного с той частью мУНТ, которая олигонуклеотид в процессе прощания. Соответственно временам УЗ-обработки (кривая 2, рис. 8).

Таким образом, копокрытие монокристалла в процессе самоорганизации в различных концентрациях мУНТ, расстояния от олигонуклеотида до мУНТ, характером комплекса FAM-ON1 к мУНТ становится взаимодействием. В элекганизированного на поверхности с мУНТ, олигону

нтрациях $c_{\text{МУНТ}} \sim 0,1$ сулы FAM-ON1 начи- между собой, пони- пературы от 1 до 0,59, растанию I , поскольку подвижность FAM-ON1 релаксации комплекса му состоянию с ми- гии посредством ми- го ориентационного нуклеотидном покры- ь молекул FAM-ON1 МУНТ. Вместе с тем уры также нежела- , поскольку они на- ояние с минимумом

я FAM-олигонуклео- нцентрациях МУНТ. м значении концен- п олигонуклеотида, рактически до нуля ами «■» на рис. 7). зное тушение FAM- исех концентрациях орых оптимальных одной трубки, соот- т о существовании динамически устой-

ого на МУНТ и име- $i(i+1)$, является при- и МУНТ. Например, не понижается для осительно концен- ис. 7). Дальнейшее ие толщины ON1- то он снова приоб- идного покрытия N1 становится тер- P/ON1 оказывается

неустойчивой при концентрациях $c_{\text{МУНТ}} \sim 0,2; 0,6$ мг/мл (погрешность определе- на размерами символов). Такая немонотонная зависимость интенсивности FAM- свечения от концентрации возможна, если олигонуклеотид самоорганизуется в виде подслоя конечной толщины (подоболочки) посредством кооперативного взаимодействия. Так как концентрация $c_{\text{МУНТ}} \sim 0,9$ мг/мл, при которой еще наблю- дается МУНТ-зависимое тушение, в шесть раз больше первой тушащей концен- трации $\sim 0,15$ мг/мл, то максимально наблюдаемое электрофоретическое число (n_{max}) олигонуклеотидных подоболочек порядка 6. При этом олигонуклеотидные подоболочки (подслои) нарастают на поверхности нанотрубки последовательно друг за другом с образованием электронно-плотной «шубы» (рис. 3, 4).

Ультразвуковое воздействие. При высоких концентрациях $c_{\text{МУНТ}}$ (например, 1,0 мг/мл) и времени УЗ-обработки не более 5 мин эффективность тушения флуо- ресценции уменьшается относительно низких $c_{\text{МУНТ}}$, поскольку интенсивность свечения свободного FAM-ON1 возрастает (рис. 8). При высоких дозах ультра- звуковой радиации комплексообразование МУНТ с олигонуклеотидом не толь- ко усиливается, но и частично ослабевает в результате «отшелушивания» верх- них монослоев олигонуклеотида. Это происходит при временах УЗ-обработки более 5 мин для концентраций МУНТ 0,1 мг/мл, в связи с чем интенсивность FAM-флуоресценции возрастает, как показывает кривая 1 на рис. 8. При высоких концентрациях МУНТ 1,0 мг/мл верхние монослои плотного кристаллического олигонуклеотида, слабо взаимодействующие с МУНТ, отрываются от основной массы под действием ультразвука до тех пор, пока толщина олигонуклеотидно- го покрытия не станет равной квазиустойчивой толщине олигонуклеотидного слоя l_{qust} . «Отшелушившийся» олигонуклеотид пополняет фракцию свободного FAM-ON1. Если этого количества достаточно для формирования квазиустой- чивого нуклеотидного покрытия с $l_{\text{qust}} > l$, то происходит связывание FAM-ON1 с той частью МУНТ, которая не имеет покрытия. Так как доля комплексов МУНТ/ олигонуклеотид в пробе возрастает, то количество свободных FAM-ON1 умень- шается. Соответственно, свечение FAM-зонда для $c_{\text{МУНТ}} 1$ мг/мл ослабевает при временах УЗ-обработки 10 мин, а не при 5 мин обработки как для $c_{\text{МУНТ}} 0,1$ мг/мл (кривая 2, рис. 8).

Таким образом, комплекс МУНТ/олигонуклеотид представляет собой МУНТ, покрытую монокристаллическим слоем электронно-плотного олигонуклео- тида в процессе самоорганизации. Эффект тушения флуоресценции при высо- ких концентрациях МУНТ может ослабевать, что обусловлено как возрастанием расстояния от олигонуклеотида до поверхности МУНТ, так и кооперативным характером комплексообразования, когда дальнейшее присоединение молекул FAM-ON1 к МУНТ становится энергетически невыгодно из-за ослабления π - π - взаимодействия. В электрофоретической пробе кроме олигонуклеотида, самоор- ганизованного на поверхности МУНТ, также присутствует свободный, несвязан- ный с МУНТ, олигонуклеотид.

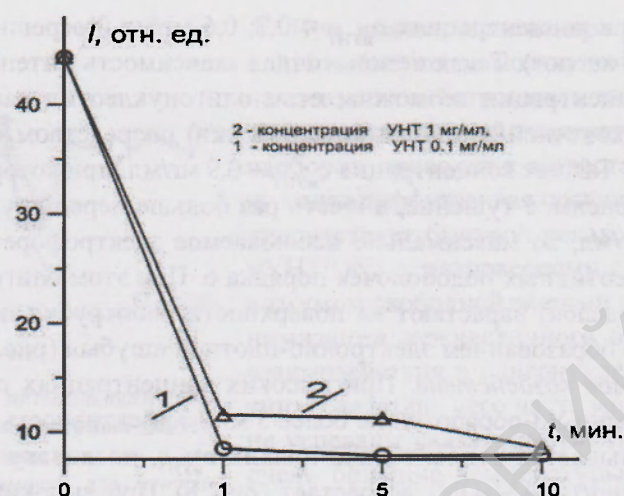


Рис. 8. Зависимость интенсивности свечения смеси олигонуклеотида FAM-ON1 с УНТ от времени ультразвуковой обработки

Рамановская спектроскопия комплексов dsДНК/мУНТ: поверхностно-усиленное комбинационное рассеяние в мУНТ на поверхности Si. Покажем, что плотная упаковка колец FAM-олигонуклеотида в кристаллической плоскости, параллельной поверхности мУНТ, обеспечивает перенос возбуждения с электронных орбиталей FAM-зонда на энергетические уровни мУНТ с последующей безызлучательной релаксацией.

Добавление плацентарной dsДНК с или без мУНТ в гексановый или спиртовой раствор стеариновой кислоты с последующей ультразвуковой обработкой дает мицеллярную форму dsДНК или комплексов dsДНК/мУНТ соответственно. Рамановский спектр мицелл с ДНК, выкапываемых на полированную кремниевую подложку, имеет все характеристические линии комбинационного рассеяния света в dsДНК [54] (рис. 9).

Слабоинтенсивные рамановские спектры высушенных мУНТ до нековалентной функционализации представлены на рис. 10, а. Рамановские спектры графена и графеноподобных материалов хорошо изучены [55]. Спектральные полосы D и D' на рис. 10 проявляют наличие дефектов в графеновой решетке и соответствуют оптическим поперечным и продольным колебаниям в плоскости вблизи точки K зоны Бриллюэна. Эти фононы являются колебаниями ядер в поле (терме) $\pi(p_z)$ -электронов валентной зоны или $\pi^*(d)$ -электронов зоны проводимости. Пик D'' – продольная акустическая мода вблизи точки K . Спектральная полоса G также происходит от колебаний атомов углерода в плоскости, но в электронно-колебательном терме sp^2 -гибридизированных электронов. Этот резонанс соответствует оптическим плоскостным фононам в окрестности точки Γ зоны Бриллюэна. D^3 и D^4 – поперечная и продольная акустические ветви плоскостных колебаний в окрестности точки Γ . $2D$ – пик двухфононного поглощения (удвоенная D -мода).

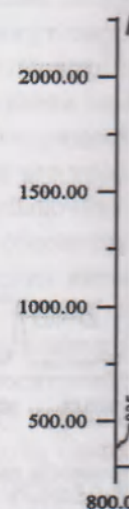


Рис. 9. Рамановский спектр кислоты и плацентарной, гуанин, тимин и цитозин. «*» – лазерный пик

Так называемая «дыра» в диапазоне от 60 до 43

Рамановские спектры представлены на рис. 10, а. Рамановские спектры графена и графеноподобных материалов хорошо изучены [55]. Спектральные полосы D и D' на рис. 10 проявляют наличие дефектов в графеновой решетке и соответствуют оптическим поперечным и продольным колебаниям в плоскости вблизи точки K зоны Бриллюэна. Эти фононы являются колебаниями ядер в поле (терме) $\pi(p_z)$ -электронов валентной зоны или $\pi^*(d)$ -электронов зоны проводимости. Пик D'' – продольная акустическая мода вблизи точки K . Спектральная полоса G также происходит от колебаний атомов углерода в плоскости, но в электронно-колебательном терме sp^2 -гибридизированных электронов. Этот резонанс соответствует оптическим плоскостным фононам в окрестности точки Γ зоны Бриллюэна. D^3 и D^4 – поперечная и продольная акустические ветви плоскостных колебаний в окрестности точки Γ . $2D$ – пик двухфононного поглощения (удвоенная D -мода).

мУНТ являются... ют высокой электропр... являются отрицатель... ния. Это – положитель...

ин.

FAM-ON1 с УНТ

ИТ: поверхностно-
ности Si. Покажем,
ической плоскости,
возбуждения с элект-
УНТ с последующей

сановый или спир-
уковой обработкой
УНТ соответственно.
юванную кремние-
национного рассея-

УНТ до нековалент-
кие спектры графе-
ктральные полосы
решетке и соответ-
з плоскости вблизи
ядер в поле (терме)
проводимости. Пик
ьная полоса G так-
в электронно-коле-
онанс соответству-
зоны Бриллюэна.
остных колебаний
удвоенная D-мода).

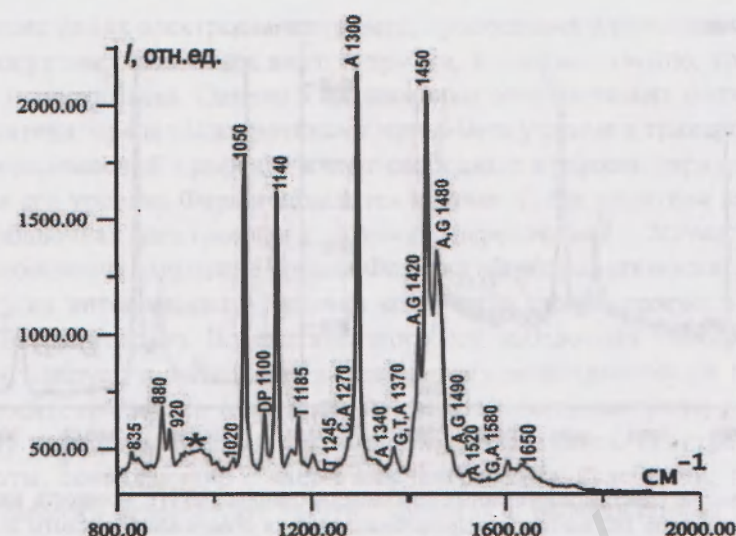


Рис. 9. Рамановский спектр мицелл, сформированных в гексановом растворе смеси стеариновой кислоты и плацентарной ДНК, на Si; лазерная мощность 20 мВт на длине волны 532 нм. Аденин, гуанин, тимин и цитозин обозначены через A, G, T и C соответственно. DP – фосфодиэфирная связь. «*» – лазерный плазмонный пик. Цифрами указаны характеристические частоты колебаний атомных групп в ДНК

Так называемая «дышащая» мода мУНТ наблюдается на рис. 10, а в частотном диапазоне от 60 до 430 см^{-1} .

Рамановские спектры dsДНК/мУНТ-комплексов в гидрофобных мицеллах представлены на рис. 10, б. Сравнение рис. 10, а и 10, б показывает, что комплексообразование значительно усиливает интенсивность УНТ-мод: $D, G, D'' + D, 2D, D' + D$. Так как характеристические моды dsДНК в спектре на рис. 10, б не наблюдаются, и следовательно, имеет место тушение свечения dsДНК, то это усиление УНТ-колебаний обусловлено переносом носителей электрического заряда и энергии квазичастичных возбуждений с нуклеотидных оснований на атомы мУНТ. Вероятность перехода электронов с валентных $\pi(p_z)$ -орбиталей нуклеотида на $\pi^*(d)$ -орбитали мУНТ так высока, что свечение молекул ДНК полностью тушится. На рис. 11, а представлен рамановский спектр монослоя гидрофильных мицелл с dsДНК/мУНТ-комплексами, находящимися на Si-подложке. Согласно рис. 11, а, тушение свечения ДНК в монослое происходит не только за счет безызлучательного переноса на мУНТ с последующим усилением D -, G -, и $2D$ -УНТ-мод, но и за счет возбуждения поверхностных и плазмонных колебаний Si-подложки.

мУНТ являются графеноподобным материалом. мУНТ, как и графен, обладают высокой электропроводностью [56]. Носителями электрического заряда в графене являются отрицательно и положительно заряженные квазичастичные возбуждения. Это – положительно и отрицательно заряженные трехчастичные экситоны [57].

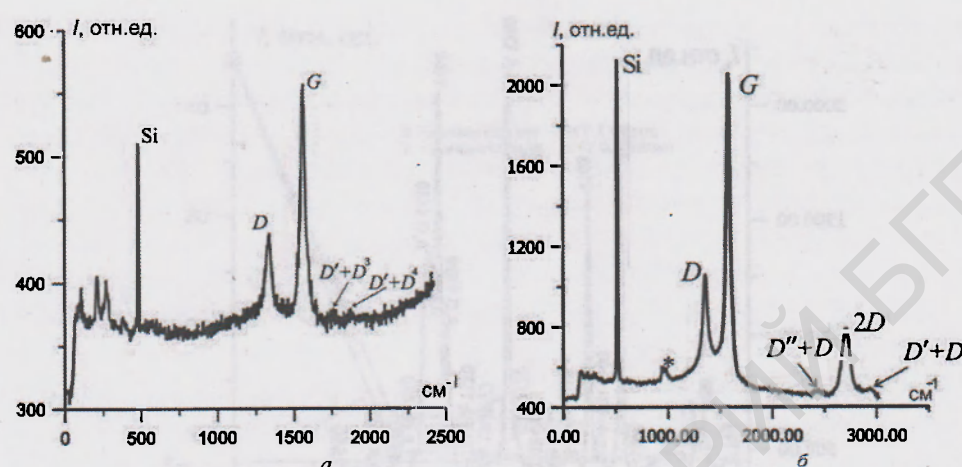


Рис. 10. Рамановские спектры высушенных карбоксилированных мУНТ, мощность накачки 20 мВт на длине волны лазера 532 нм (а); и гидрофобных мицелл стеариновой кислоты с комплексами мУНТ/ДНК, мощность накачки 5,76 мВт на длине волны лазера 473 нм (б). Символы «Si» и «*» обозначают колебательную моду кремния и лазерный плазмонный пик соответственно

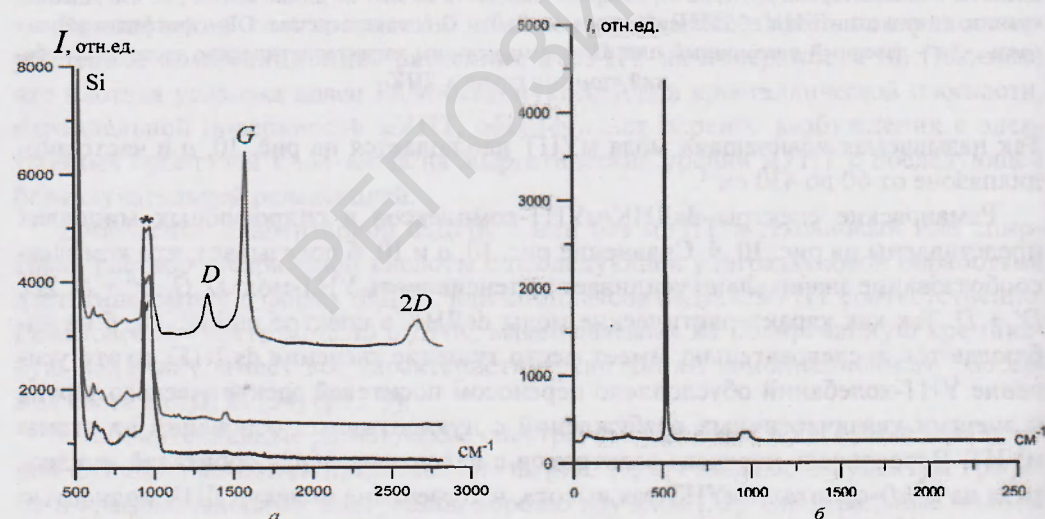


Рис. 11. Рамановские спектры монослоя комплексов мУНТ/ДНК на поверхности кремния при мощности накачки 3,0, 5,76 и 20 мВт для нижней, промежуточной и верхней кривых соответственно (а). Комбинационное рассеяние света кремниевой подложкой, мощность накачки 20 мВт (б). Возбуждение лазером на длине волны 532 нм. Символы «Si» и «*» обозначают колебательную моду кремния (520 cm^{-1}) и лазерный пик плазмонного рассеяния в кремнии соответственно

Носители заряда в беспримесном графене локализуются в отдельных областях валентной зоны (в так называемых лужах) конуса [56] и не попадают в K -точку – вершину дираковского конуса.

Модель локализации электронов углеродной нанотрубки в слабом электрическом поле была построена в [58]. Согласно этой модели, в слабоинтенсивных

электрических полях э «зигзаг» могут локали дырочную проводимос ванные носители заряд

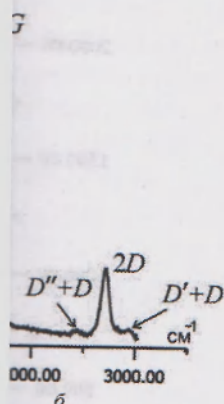
Хотя беспримесны полярности его уровен ствуют. Добавочная э единений, обеспечит с

При низких интенс на мУНТ, незначи тельность аннигилирует, а фоновых носителей за зоны в зону проводим ются частоты, совпада Si параметрически рез подсистемы Si (возрас это следует из сравнен

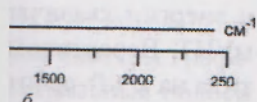
С ростом интенс лизованных носителей плотность, переносима часть ее становится п π^* -орбиталях мУНТ, я сматривать эту примес яния пузырьков стаби и распадом последних кой внутри подобен а дифракции на границе фекту Ханле – смеси со следующим значе ние описывается волн

Рассмотрим перехо том импульса $J - j_d$ и углового момента L Переход из состояния щен. Этот запрещенны промежуточная крива: усиленной интенсивн

При больших инте эффект Ханле, привод весным спином $S = 0$ и



Плотность накачки 20 мВт
кислоты с комплексами
(б). Символы «Si» и «*»
и соответствуют



ости кремния при мощ-
кривых соответственно
акации 20 мВт (б). Воз-
т колебательную моду
и соответственно

дельных областях
падают в K-точку —

в слабом электри-
слабоинтенсивных

электрических полях электроны, например, проводящих одностенных УНТ типа «зигзаг» могут локализоваться внутри трубки, и соответственно, трубки имеют дырочную проводимость. Однако в интенсивных электрических полях локализованные носители заряда также начинают принимать участие в транспорте заряда.

Хотя беспримесный графен и имеет свободные носители заряда, в силу биполярности его уровень Ферми находится в точке K, где носители заряда отсутствуют. Добавочная электронная плотность, переносимая с ароматических соединений, обеспечит смещение уровня Ферми в зону проводимости.

При низких интенсивностях накачки количество заряда, перенесенного с ДНК на мУНТ, незначительно. Вследствие этого вся добавочная электронная плотность аннигилирует, а высвободившаяся энергия затрачивается на переход графеновых носителей заряда (отрицательно заряженных экситонов) из валентной зоны в зону проводимости. Так как в широком экситонном спектре мУНТ имеются частоты, совпадающие с частотами плазменных колебаний, то плазмоны Si параметрически резонируют на этих частотах с раскачиванием электронной подсистемы Si (возрастание интенсивности рамановского спектра линий Si), как это следует из сравнения нижней кривой на рис. 11, а и графика на рис. 11, б.

С ростом интенсивности лазерного возбуждения из-за малого числа локализованных носителей заряда в чистом графене не вся добавочная электронная плотность, переносимая с ароматических соединений, аннигилирует, и поэтому часть ее становится примесью. Так как добавочные электроны, находящиеся на π^* -орбиталях мУНТ, являются локализованными d-электронами, то можно рассматривать эту примесь как пузырьки с локализованными d-электронами. Состояния пузырьков стабилизируются переходом дырок отрицательных экситонов и распадом последних. Получившийся пузырек электронной плотности с дыркой внутри подобен атому. Многофотонное поглощение за счет отражательной дифракции на границе пузырька электронной плотности с дыркой приведет к эффекту Ханле — смешиванию d-орбитали с s-подобными орбиталями из оболочки со следующим значением главного квантового числа n. Это смешанное состояние описывается волновой функцией

$$|\Psi\rangle = |d\rangle + f(H_{ext})|s\rangle. \quad (2)$$

Рассмотрим переход с p-орбиталей на уровни состояния (2) с полным моментом импульса $J = j_d + j_s - L + S = 1$ при значении неравновесного спина $S = 0$ и углового момента $L = 1$. Эффект Ханле приводит к расщеплению p-орбиталей. Переход из состояния с моментом импульса $J = 2(l - s) = 1$ с $l = 1$ и $s = 1/2$ запрещен. Этот запрещенный переход проявляется в рамановском спектре на рис. 11, а, промежуточная кривая как небольшой пик на частоте $\sim 1410 \text{ см}^{-1}$, наряду с УНТ-усиленной интенсивностью спектра комбинационного рассеяния Si.

При больших интенсивностях лазерной накачки наблюдается осцилляторный эффект Ханле, приводящий к вырождению p-орбиталей в состояние с неравновесным спином $S = 0$ и орбитальным моментом $L = 1$. В этом случае атомоподоб-

ные пузырьки d -электронов с дырками в их электронной плотности в качестве донорных примесей могут также добавить недостающую электронную плотность в окрестности точки K графена посредством резонансного возбуждения когерентных отрицательно заряженных экситонов X^- («дифракционных экситонов») [53]. Поскольку переходы p -электронов с вырожденных орбиталей $S = 0, L = 0$ в смешанное состояние $S = 0, L = 1$ разрешены, то возбужденные p -электроны могут гибридизировать с $\pi^*(d)$ -орбиталями мУНТ. Появившаяся гибридизационная щель приведет к переходу электронов на $\pi(p)$ -орбитали с испусканием фотонов, энергия которых затрачивается на переход графеновых носителей заряда (отрицательно заряженных экситонов) из валентной зоны в зону проводимости. В результате, точно также как при низких интенсивностях, параметрический резонанс колебательных и плазмонных частот Si на собственных частотах свободных носителей заряда приведет к мУНТ-усиленному резонансному рамановскому спектру Si на рис. 11, а, верхняя кривая.

Дефекты в виде донорных примесных уровней пузырьков с d -электронами проявляются в процессе гибридизации орбиталей смешанного состояния $S = 0, L = 1$ с $\pi^*(d)$ -орбиталями мУНТ в зоне проводимости (точке K зоны Бриллюэна) через их рассеяние на колебательных D - и $2D$ -модах графеноподобной зонной структуры углеродных нанотрубок на рис. 11, а, верхняя кривая. Кроме того, квазичастичные возбуждения X^- резонируют с s -электронами углерода C, участвующими в sp^2 -гибридизации, и соответственно, экситонная энергия рассеивается в рамановскую полосу G, как видно на рис. 11, а, верхняя кривая.

В отличие от $2D$ -упаковки dsДНК/мУНТ-комплексов в монослое, в гидрофобных мицеллах стеариновой кислоты с dsДНК/мУНТ-комплексами, рамановский спектр которых приведен на рис. 10, б, имеет место трехмерная упаковка. Рассчитаем радиус экситона X^- по формуле $r_{X^-} = \frac{1}{2} \sqrt{\pi a d}$ [59]. Здесь d – толщина проводящей части образца – в нашем случае диаметр мУНТ; a – радиус экситона в объемном образце. Для монослоя смеси dsДНК с мУНТ значение a равно размеру dsДНК/мУНТ-комплекса: от 10 до 20 нм, для гидрофобных мицелл выберем в качестве a их размер 1 мкм. Тогда рассчитанный радиус экситона X^- в этих мицеллах оказывается в 10 раз больше, чем в монослое. Поэтому слабая связь в электрон-дырочных парах обуславливает их локализацию на дефектах. Как видно из сравнения рис. 10, б с рис. 11, а, в связи с понижением числа свободных носителей заряда число толчков в параметрическом резонансе понижается и, соответственно, на рис. 10, б интенсивность лазерного плазмонного пика и комбинационного рассеяния Si снижается, как и интенсивность X^- -усиленных рамановских спектральных полос графена: D , G , $2D$. Локализованные экситоны распадаются в $D + D'$ - и $D + D''$ -моды на рис. 10, б.

Плотное прилегание ароматических колец FАМ к мУНТ также, как и плотная упаковка нуклеотидных гетероциклов, обеспечивает дальний зарядовый перенос с возникновением транспорта свободных экситонных носителей заряда. Таким

образом, в комплексе механизм наноразмер

**Электрофоретиче-
родных нанотрубок**
спектроскопия показателем позволяет углеродных нанотрубок и нанотрубок при разработке новых нанотрубок при комплексном восстановлении флуоресценции с целевой ss-ДНК гетеродуплексный анализ в месте негомологии замены фрагментов, электрофоретическую формационных особоматчей [3; 4; 6].

Для определения мУНТ с целью генотипирования олигонуклеотида FАМ с нуклеотидными последовательностями комплементарности оценивали по увеличению флуоресценции группы за счет исчезновения комплекса мУНТ/FАМ с нуклеотидными д

Для оптимизации метры, как время гибридизации элементарного целого соотношения в реакциях формирования гомодуплекса с комплементарным элементом флуоресценции эффект объясняется флуоресценцией нуклеотидными основания

Согласно рис. 12 для случая полной комплементарности пар. Интенсивность флуоресценции для случая полной комплементарности близка к интенсивности флуоресценции парами. Поэтому исследование электрофореза недо

ности в качестве дотронную плотность возбуждения когезионных экситонов») италей $S = 0$, $L = 0$ денные p -электроны аяся гибридизацион-а с испусканием фо-ых носителей заряда зону проводимости. параметрический ре-ых частотах свобод-ному рамановскому

ков с d -электронами юго состояния $S = 0$, е K зоны Бриллюэна) еноподобной зонной явая. Кроме того, ква-углерода C , участву-энергия рассеивается ивая. ионное, в гидрофоб-ексами, рамановский ная упаковка. Рассчи-есь d – толщина про-; a – радиус экситона значение a равно раз-ных мицелл выберем ус экситона $X^{\cdot-}$ в этих Поэтому слабая связь ию на дефектах. Как жением числа свобод-резонансе понижает-ого плазмонного пика ивность $X^{\cdot-}$ -усиленных ализованные экситоны

Т также, как и плотная ний зарядовый перенос сителей заряда. Таким

образом, в комплексах мУНТ/FAM–олигонуклеотид имеет место экситонный механизм наноразмерного тушения FAM-флуоресценции.

Электрофоретическое детектирование гибридизации на комплексах углеродных нанотрубок с олигонуклеотидом. ПААГ-электрофорез и рамановская спектроскопия показали, что связывание мУНТ с FAM-меченным олигонуклеотидом позволяет углеродным нанотрубкам функционировать в качестве эффективных нанотушителей флуорофора FAM. Данный эффект может быть использован при разработке нового подхода к выявлению SNP на основе тушения флуоресценции при комплексообразовании FAM-олигонуклеотида с мУНТ с последующим восстановлением флуоресценции в результате гибридизации FAM-олигонуклеотида с целевой ss-ДНК-последовательностью в растворе [20]. Далее проведем гетеродуплексный анализ (ГА). Из-за возникновения структурных нарушений в месте негомолгичного спаривания нормальных и содержащих нуклеотидные замены фрагментов ДНК или олигонуклеотидов гетеродуплексы имеют иную электрофоретическую подвижность по сравнению с гомодуплексами за счет конформационных особенностей в местах некомплементарных нуклеотидов – мис-матчей [3; 4; 6].

Для определения возможности использования молекулярных бакенов на основе мУНТ с целью генотипирования ОНП, гибридизация свободного FAM-меченного олигонуклеотида FAM-ON1 и комплекса мУНТ/FAM-ON1 с целевыми олигонуклеотидными последовательностями (ДНК-мишень, табл. 1) различной степени комплементарности осуществлялась в растворе. Эффективность гибридизации оценивали по увеличивающейся интенсивности флуоресценции репортёрной группы за счет исчезновения эффекта тушения, вызванного диссоциацией комплекса мУНТ/FAM–олигонуклеотид и формирования в растворе гибридизационных нуклеотидных дуплексов [29] по завершении электрофореза.

Для оптимизации условий гибридизации были протестированы такие параметры, как время гибридизации и соотношения концентраций FAM-ON1 и комплементарного целевого олигонуклеотида ON2 в гибридизационном буфере; это соотношение в реакционной смеси варьировало в пределах 1 : 1, 1 : 3 и 1 : 6. При формировании гомодуплекса в результате гибридизации FAM-олигонуклеотида с комплементарным целевым олигонуклеотидом ON2 резко возрастает интенсивность флуоресценции FAM-флуорофора (рис. 12, а, дорожки 2–10). Данный эффект объясняется ослаблением взаимодействия FAM-флуорофора с нуклеотидными основаниями, образовавшими гомодуплекс [5].

Согласно рис. 12, б, интенсивность FAM-свечения для гетеродуплекса с тремя некомплементарными парами больше, чем в случае одной некомплементарной пары. Интенсивность свечения ON1/ON5 сравнима с интенсивностью свечения для случая полностью некомплементарного ON4. Наибольшей электрофоретической подвижностью обладает ON1/ON4. Интенсивность свечения гомодуплекса близка к интенсивности свечения гетеродуплекса с тремя некомплементарными парами. Поэтому использование флуоресцентной метки при проведении ПААГ-электрофореза недостаточно, чтобы осуществить SNP-генотипирование.

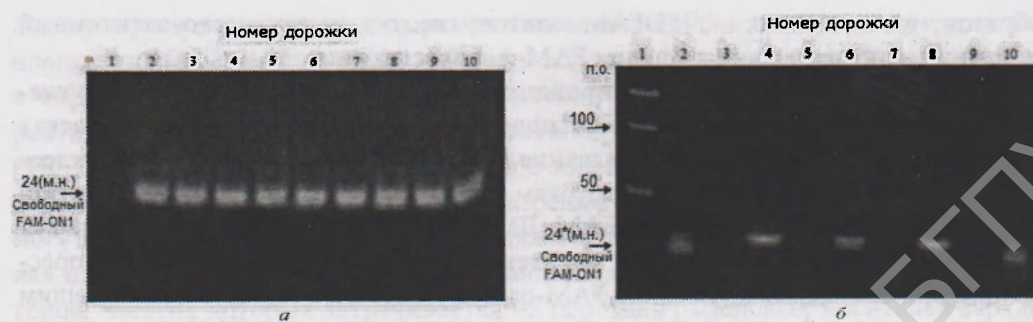


Рис. 12. Изменение интенсивности флуоресценции и электрофоретической подвижности дуплексов олигонуклеотид/олигонуклеотид, образовавшихся при гибридизации в растворе: *а* – зависимость от условий гибридизации (соотношение FAM-ON1 к ON2 в гибридизационной смеси и время гибридизации); *б* – зависимость от природы дуплекса. Дорожки: 1 – FAM-ON1 (контроль); с 2 по 10 – гомодуплекс FAM-ON1/ON2 при соотношениях FAM-ON1 к ON2, равных 1 : 1, 1 : 3, 1 : 6 соответственно; $t = 15$ мин для дорожек 2–4; $t = 30$ мин для дорожек 5–7; $t = 60$ мин для дорожек 8–10; *б* – зависимость от природы дуплекса. Дорожки: 1 – ДНК-маркер; 2 – FAM-ON1 (контроль); 3 – комплементарный олигонуклеотид ON2 (контроль); 4 – гомодуплекс FAM-ON1/ON2; 5 – олигонуклеотид с одним SNP (ON5) (контроль); 6 – гетеродуплекс FAM-ON1/ON5; 7 – нуклеотид с тремя SNP (ON3) (контроль); 8 – гетеродуплекс FAM-ON1/ON3; 9 – некомплементарный олигонуклеотид (ON4) (контроль); 10 – гетеродуплекс FAM-ON1/ON4

Максимальная интенсивность флуоресценции соответствовала гомодуплексу, полученному в результате гибридизации, продолжавшейся в течение 60 мин (рис. 12, *а*, дорожки 8–10). Интенсивность флуоресценции, соответствующей гомодуплексу, полученному при трех- и шестикратном увеличении концентрации комплементарного целевого олигонуклеотида в растворе (для каждого временного интервала) свидетельствует о том, что повышение концентрации не оказало заметного влияния на результаты гибридизации (рис. 12, *а*, дорожки 5–7 и 8–10). Поэтому проведение гибридизации FAM-олигонуклеотида с комплементарным целевым олигонуклеотидом в растворе оптимально при следующих условиях: эквимольное соотношение FAM-ON1/ON2; время гибридизации – 60 мин.

На основании вышеприведенных результатов, полученных с помощью метода гетеродуплексного анализа, исследована гибридизация целевых олигонуклеотидов различной степени комплементарности с входящим в комплекс МУНТ/FAM-олигонуклеотид FAM-олигонуклеотидом в растворе.

Как следует из анализа электрофореграммы, приведенной на рис. 13, *а*, присутствие в растворе комплементарного олигонуклеотида ON2 сопровождалось полным восстановлением флуоресценции FAM-олигонуклеотида, входившего в состав комплекса МУНТ/FAM-олигонуклеотид. Интенсивность восстановленной флуоресценции и электрофоретическая подвижность гомодуплекса полностью совпадали с аналогичными параметрами гомодуплекса, образовавшегося в результате гибридизации в растворе между свободным FAM-ON1 и комплементарным ему олигонуклеотидом ON2 (рис. 13, *а*, дорожки 5 и 6). Кроме того,

о формировании гибридных полос, соответствующей массе и свободной

Восстановление флуоресценции комплекса МУНТ/олигонуклеотида в растворе [52]. В случае ON4, некомплементарного олигонуклеотида, восстановление интенсивности флуоресценции комплекса FAM-олигонуклеотида в свободном состоянии уменьшилось (рис. 13, *б*, дорожка 4). В случае ON5, олигонуклеотида с одним SNP, восстановление интенсивности флуоресценции комплекса FAM-олигонуклеотида в свободном состоянии уменьшилось (рис. 13, *б*, дорожка 6). В случае ON3, олигонуклеотида с тремя SNP, восстановление интенсивности флуоресценции комплекса FAM-олигонуклеотида в свободном состоянии уменьшилось (рис. 13, *б*, дорожка 8). В случае ON4, олигонуклеотида с четырьмя SNP, восстановление интенсивности флуоресценции комплекса FAM-олигонуклеотида в свободном состоянии уменьшилось (рис. 13, *б*, дорожка 10). В случае ON5, олигонуклеотида с одним SNP, восстановление интенсивности флуоресценции комплекса FAM-олигонуклеотида в свободном состоянии уменьшилось (рис. 13, *б*, дорожка 6). В случае ON3, олигонуклеотида с тремя SNP, восстановление интенсивности флуоресценции комплекса FAM-олигонуклеотида в свободном состоянии уменьшилось (рис. 13, *б*, дорожка 8). В случае ON4, олигонуклеотида с четырьмя SNP, восстановление интенсивности флуоресценции комплекса FAM-олигонуклеотида в свободном состоянии уменьшилось (рис. 13, *б*, дорожка 10).

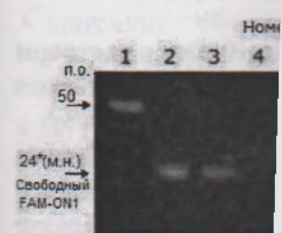


Рис. 13. Флуоресценция комплекса МУНТ/олигонуклеотида и некомплементарного олигонуклеотида (ON4) в растворе. Дорожки: 1 – ДНК-маркер; 2 – FAM-ON1; 3 – олигонуклеотид ON2; 4 – гетеродуплекс FAM-ON1/ON4



й подвижности дуплек-
а в растворе: a – зави-
идизационной смеси и
омодуплекс FAM-ON1/
ственно; $t = 15$ мин для
– зависимость от при-
комплементарный оли-
гуклеотид с одним SNP
я SNP (ON3) (контроль);
д (ON4) (контроль); 10 ;

вовала гомодуплексы в течение 60 мин соответствующей концентрации каждого временнотриации не оказало орощки 5–7 и 8–10). комплементарным едующих условиях: ции – 60 мин. их с помощью мето- вых олигонуклеоти- мплекс мУНТ/ФАМ-

й на рис. 13, а, при N2 сопровождалось эотиды, входившего ность восстановления модуплекса полно- а, образовавшегося AM-ON1 и компле- 5 и б). Кроме того,

о формировании гибридизационного гомодуплекса можно судить по положению полосы, соответствующей данному дуплексу, относительно маркера молекулярной массы и свободного FAM-ON1 (рис. 13, *а*, дорожка *б*).

Восстановление флуоресценции репортерной группы обусловлено диссоциацией комплекса мУНТ/FAM-олигонуклеотид и формированием гибридного гомодуплекса в присутствии целевого комплементарного олигонуклеотида в растворе [52]. В случае же присутствия в растворе целевого олигонуклеотида ON4, некомплементарного FAM-ON1, наблюдалось только незначительное восстановление интенсивности флуоресценции, которая по интенсивности соответствовала флуоресценции свободного FAM-ON1 вне зависимости от того, входил ли FAM-олигонуклеотид до гибридизации в состав комплекса или находился в свободном состоянии (рис. 13, а, дорожки 8 и 9). Наблюдаемое сравнительное уменьшение интенсивности флуоресценции для дуплексов, содержащих один мисматч, было примерно в три раза ниже, чем для полностью комплементарных дуплексов (рис. 13, б, дорожки 5, 6 и 8, 9). Более того, электрофоретическая подвижность гетеродуплексов с одним мисматчем была меньше, чем у гомодуплексов (рис. 13, б, дорожки 6 и 9). В отличие от рис. 12, б, в присутствии мУНТ имеет место уменьшение электрофоретической подвижности гетеродуплекса, содержащего один мисматч, по сравнению с гомодуплексом. Таким образом, оказывается, что ГА на основе явления диссоциации комплексов мУНТ/FAM-олигонуклеотид, как высокочувствительных «нанобакенов», зависит от параметров мУНТ. Так как параметры последних не проявляются электрофоретически, то неполная диссоциация мУНТ/FAM-олигонуклеотид в процессе гибридизации делает электрофоретический ГА неоднозначным.

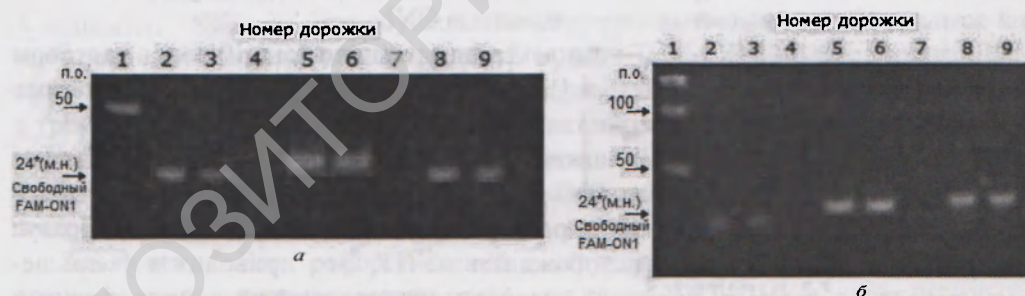


Рис. 13. Флуоресценция FAM-меченного олигонуклеотида при образовании дуплексов после диссоциации комплекса мУНТ/FAM-ON1 ($c_{\text{мУНТ}} = 0,04$ мг/мл): а – гибридизация с комплементарным и некомплементарным олигонуклеотидами. Дорожки: 1 – ДНК-маркер; 2 – FAM-ON1; 3 – комплекс мУНТ/FAM-ON1; 4 – комплементарный олигонуклеотид ON2; 5 – гомодуплекс FAM-ON1/ON2 без мУНТ; 6 – гомодуплекс FAM-ON1/ON2 с FAM-ON1/мУНТ; 7 – некомплементарный олигонуклеотид (ON4); 8 – гетеродуплекс FAM-ON1/ON4 без мУНТ; 9 – гетеродуплекс FAM-ON1/ON4 с FAM-ON1/мУНТ; б – гибридизация с олигонуклеотидом, содержащим одиночный SNP. Дорожки: 1 – ДНК-маркер; 2 – FAM-ON1; 3 – комплекс мУНТ/FAM-ON1; 4 – комплементарный олигонуклеотид ON2; 5 – гомодуплекс FAM-ON1/ON2 без мУНТ; 6 – гомодуплекс FAM-ON1/ON2 с FAM-ON1/мУНТ; 7 – олигонуклеотид с SNP (ON5); 8 – гетеродуплекс FAM-ON1/ON5 без мУНТ; 9 – гетеродуплекс ON1/ON5 с FAM-ON1/мУНТ

Электрохимическая импедансная спектроскопия ДНК-дуплексов. Приведем результаты электрохимического анализа степени связывания различных типов dsДНК с МУНТ.

В бидистиллированной воде диэлектрические свойства ЛБ-пленок МУНТ и комплексов олигонуклеотид/МУНТ проявляются в виде изменения электрической емкости двойного заряженного слоя Гельмгольца, формируемого на границе раздела фаз: изоляторный барьерный слой анодного оксида алюминия–вода. Для электрохимического детектирования использовались две области частот: низкочастотная (~100 кГц) и высокочастотная (~400–800 кГц). В низкочастотной области основной вклад в поляризацию пленки дает максвелл-вагнеровская поляризация проводящих включений. Вектор дипольной поляризации молекул или молекулярных групп релаксирует в высокочастотной области.

ЛБ–УНТ-кластеры эффективно экранируют электроды вследствие баллистического транспорта заряда в МУНТ. Поэтому процесс ионизации молекул воды в электрическом поле электродов подавляется и, соответственно, электрическая емкость $C_{\text{МУНТ}}$ датчика с ЛБ–УНТ-кластерами становится меньше, чем емкость чистого датчика. В высокочастотной области уменьшение $C_{\text{МУНТ}}$ составляет ~–1÷–1,5 пФ и практически не зависит от частоты.

Диэлектрическая проницаемость олигонуклеотидной оболочки в ЛБ–ssДНК/МУНТ-комплексах высокая, а степень экранирования значительно снижена из-за большого шага спирали и, как следствие, зарядового транспорта, в основном, поперек спирали, и соответственно, имеет место возрастание емкости датчика $C_{\text{ssДНК/УНТ}}$ на $\Delta C_{\text{ssДНК/УНТ}} > 0$. В высокочастотной области $\Delta C_{\text{ssДНК/МУНТ}}$ практически не зависит от частоты и принимает значения от +2 до +6 пФ, определяемые массой компактифицированного олигонуклеотида ON1.

Датчики с ЛБ–ssДНК/МУНТ-комплексами помещались на 10 мин в растворы различных олигонуклеотидов (табл. 1). Затем датчик отмывался от несвязанного олигонуклеотида в течение 10 мин в воде при температуре 39 °С.

В *низкочастотной области* можно оценить возрастание доли проводящих ЛБ–УНТ-кластеров из-за выхода ON1 из ssДНК/МУНТ с образованием дуплексов dsДНК. Как видно на рис. 14, а, распознаваемые олигонуклеотиды, образуя дуплексы dsДНК, частично высвобождают МУНТ. Это приводит к уменьшению емкости в сторону значений емкости сенсора только с проводящими ЛБ–УНТ-кластерами. S-образная зависимость на рис. 14, а определяется кооперативным связыванием ON2 с ON1. Низкочастотное значение емкости сенсора с гомодуплексами ON1/ON2 оказывается наиболее смещенным к $C_{\text{МУНТ}}$ из-за эффекта расслоения фаз в фазовом переходе от ssДНК/МУНТ-комплексов к двухспиральной ДНК. Этот эффект уменьшается при образовании гетеродуплексов ON1/ON_i, $i = 3, 4, 5$.

Мы можем оценить величину дипольной поляризации dsДНК/МУНТ в *высокочастотной области*, где из-за больших релаксационных времен вклад максвелл-вагнеровской поляризации пренебрежимо мал. Это позволяет определить

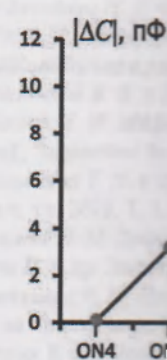


Рис. 14. а – Модуль низкочастотного взаимодействия ON1 с олигонуклеотидами

степень гетерогенности dsДНК/МУНТ по форм

$$s_h = 1 - \frac{C_d}{C_s}$$

Здесь $C_{\text{dsДНК/МУНТ}}$ – емкость dsДНК/МУНТ. Кривая для олигонуклеотидов ON1/ON2 имеет значение $C_{\text{dsДНК/МУНТ}} \rightarrow C_{\text{МУНТ}}$ в фазовом переходе от ssДНК/МУНТ к dsДНК/МУНТ. Это связано с тремя ошибками измерения емкости сенсора в фазовом переходе от ssДНК/МУНТ к dsДНК/МУНТ, что выражается в $C_{\text{ssДНК/УНТ}}$ и, соответственно, в $C_{\text{ssДНК/МУНТ}}$.

Заключение. Электрохимический анализ комплексов и изучение механизмов взаимодействия с карбоксилатными группами на карбоксилатированной поверхности с теорию переноса энергии в нанотрубах с ДНК. Результаты генотипирования и фенотипирования с помощью плотного самоорганизующегося слоя.

Работа выполнена

с-дуплексов. При-
ливания различных

ЛБ-пленок МУНТ
енения электриче-
руемого на грани-
а алюминия–вода.
е области частот:
. В низкочастотной
л-вагнеровская по-
зации молекул или

едствие баллисти-
ции молекул воды
нно, электрическая
ньше, чем емкость
: $C_{МУНТ}$ составляет

ючки в ЛБ–ssДНК/
ельно снижена из-
порта, в основном,
е емкости датчика
нк/МУНТ практически
определяемые мас-

10 мин в растворы
ся от несвязанного
°С.

доли проводящих
азованием дуплек-
/клеотиды, образуя
иводит к уменьше-
со с проводящими
пределяется коопе-
ние емкости сенсо-
нным к $C_{МУНТ}$ из-за
-комплексов к двух-
и гетеродуплексов

IsДНК/МУНТ в вы-
времен вклад мак-
звоняет определить

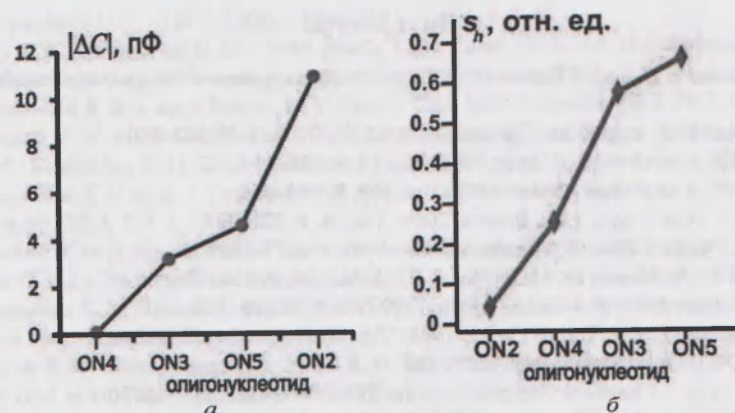


Рис. 14. а – Модуль низкочастотного изменения электрической емкости сенсора $|\Delta C|$, $\Delta C < 0$ из-за взаимодействия ON1 с олигонуклеотидами ON2, ON3, ON4, ON5; б – зависимость степени s_h гетерогенности сенсорного покрытия от типа олигонуклеотида на частоте ~ 700 кГц

степень гетерогенности s_h сенсорного покрытия через относительное содержание dsДНК/МУНТ по формуле

$$s_h = 1 - \frac{C_{dsДНК/МУНТ} - C_{МУНТ}}{C_{ssДНК/МУНТ} - C_{МУНТ}} = \frac{C_{ssДНК/МУНТ} - C_{dsДНК/МУНТ}}{C_{ssДНК/МУНТ} - C_{МУНТ}}$$

Здесь $C_{dsДНК/МУНТ}$ – электрическая емкость сенсора, покрытие которого содержит dsДНК/МУНТ. Как видно на рис. 14, б, наиболее гетерогенное покрытие получается для олигонуклеотида ON5 с одной ошибкой, когда высокочастотное значение $C_{dsДНК/МУНТ}$ определяется дипольной поляризацией собственно УНТ: $C_{dsДНК/МУНТ} \rightarrow C_{МУНТ}$. Это обусловлено компенсацией дипольных моментов нуклеотидных оснований в возникающей нуклеотидной паре. Число водородных связей между ssДНК/МУНТ и некомплементарным ON4 или олигонуклеотидом ON3 с тремя ошибками меньше, чем для ON5. Полный выход dsДНК из ON1/ON2/МУНТ в фазовом переходе к чисто олигонуклеотидной фазе сохраняет гомогенность покрытия, что выражается в близости высокочастотных значений $C_{dsДНК/МУНТ}$ и $C_{ssДНК/МУНТ}$ и, соответственно, s_h к нулю.

Заключение. Электрофоретический и структурный анализ ДНК/МУНТ-комплексов и изучение рамановского рассеяния света УНТ–ДНК-содержащими мицеллами показали, что происходит сильная компактификация однострочной ssДНК на карбоксилированных малостенных УНТ, модифицированных молекулами стеариновой кислоты. Методами диэлектрической и рамановской спектроскопии установлены экситонный механизм транспорта заряда и дальний (резонансный) перенос энергии в наноструктурных комплексах малостенных углеродных нанотрубок с ДНК. Предложен высокочувствительный метод для практического генотипирования однонуклеотидного полиморфизма ДНК на УНТ с электронно-плотным самоорганизованным олигонуклеотидным покрытием.

Работа выполнена при финансовой поддержке БРФФИ, проект № Ф12РА-002.

Литература

1. Дмитриенко Е. В. и др. // Вестн. НГУ. Сер.: Биология, клиническая медицина. 2012. Т. 10, № 4. С. 166–180.
2. Красицкая В. В. и др. // Биоорг. химия. 2012. Т. 38, № 3. С. 342–350.
3. Arguello J. R. et al. // Nat. Genet. 1998. Vol. 18. P. 192–194.
4. Ganguly T. et al. // Hum. Genet. 1998. Vol. 102. P. 549–556.
5. Isacson J. et al. // Mol. Cell. Probes. 2000. Vol. 14. P. 321–328.
6. Nataraj A. et al. // Electrophoresis. 1999. Vol. 20. P. 1177–1185.
7. Kruglyak L., Nickerson D. // Nat. Genet. 2001. Vol. 27. P. 234–236.
8. Taillon-Miller, Kwok P. // Genome Res. 1999. Vol. 9. P. 499–505.
9. Cavalli-Sforza L. L. // Trends Genet. 1998. Vol. 14. P. 60–65.
10. Ha T. // Curr. Opin. Struct. Biol. 2001. Vol. 11. P. 287–292.
11. Sheng P. et al. // Chemical Communications. 2008. Vol. 41. P. 5128–5130.
12. Giesendorf B. et al. // Clin. Chem. 1998. Vol. 44. P. 482–486.
13. Sun X. // J. Biochips & Tissue chips. 2012. Vol. 2, N 1. P. 107.
14. Bansal J. et al. // J. Biosci. Bioengin. 2013. Vol. 115, N 4. P. 438–441.
15. Cardullo R. et al. // Proc. Natl. Acad. Sci. 1988. Vol. 85. P. 8790–8794.
16. Shakeel S. et al. // J. Chem. Technol. Biotechnol. 2006. Vol. 81. P. 892–899.
17. Wong M. L., Medrano J. F. // BioTechniques. 2005. Vol. 39. P. 75–85.
18. Van Hooijdonk E. et al. // Beilstein J. Nanotechnol. 2013. Vol. 4. P. 129.
19. Zhao X. et al. // J. Am. Chem. Soc. 2003. Vol. 125. P. 114–118.
20. Stoermer R. L., Keating C. D. // J. Am. Chem. Soc. 2006. Vol. 128. P. 13243.
21. Грушевский В. В. и др. Медико-социальная экология личности: состояние и перспективы. Материалы 10-й междунар. конф., 6–7 апр. 2012 г. Минск, 2012. С. 141–142.
22. Плешко Н. В. и др. IV конгрессе физиков Беларуси: сб. науч. тр., Минск, 24–26 апр. 2013 г. Минск, 2013. С. 231–232.
23. Плешко Н. В. и др. Медико-социальная экология личности: состояние и перспективы. Материалы 11-й междунар. конф., 17–18 мая 2013 г. Минск, 2013. С. 218–221.
24. Grushevskaya H. V. et al. // Scientific J. Proc. Int. Conf. Nanomaterials: Applications and Properties. 2013. Vol. 2, N 4. P. 04NABM22.
25. Egorov A. S. et al. // J. Phys. CS. 2014.
26. Zhu Zh. et al. // Anal. Bioanal. Chem. 2010. Vol. 396. P. 73–83.
27. Li H. et al. // J. Mater. Chem. 2011. Vol. 21. P. 824–828.
28. Egorov A. S. et al. Foundations & Advances in Nonlinear Science. Materials of 14th Int. Conference – School. Minsk, 2012. P. 57–58.
29. Велизюра А. А. и др. // Науч. вестн. Ужгородского ун-та. Сер. Физика. 2013. Вып. 32. С. 94–100.
30. Brush C. K. US Patent 5,583,236.
31. Tsourkas A. et al. // Nucleic Acids Res. 2003. Vol. 31. P. 1319–1330.
32. Hailong Li et al. // J. Mater. Chem. 2011. Vol. 21. P. 824–828.
33. Анарцин Е. К. и др. // Российские нанотехнологии. 2012. Т. 7, № 3–4. С. 38–45.
34. Хорунжая О. В. и др. // Біофізичний вісник. 2010. Вып. 24 (1). С. 5–13.
35. Egorov A. S. et al. // Nonlin. Phen. in Complex Sys. 2012. Vol. 15, N 2. P. 121–137.
36. Grushevskaya H. V. et al. // Nonlin. Phen. in Complex Sys. 2010. Vol. 13, N 4. P. 396–498.
37. Реагенты для молекулярной биологии [Электронный ресурс]. – Режим доступа: www.primetech.by.
38. Labunov V. A. et al. // Semiconductor Physics, Quantum Electronics & Optoelectronics. 2011. Vol. 2. P. 137–141.
39. Labunov V. A. et al. // Physica status solidi (a). 2010. P. 1–6.
40. Hursky L. I. et al. // Official Bulletin of the National Centre of Intellectual Property. 2013. Vol. 5 (92). P. 14.

41. Grushevskaya H. V.
42. Kel'in A. V., Kulink
43. Абрамов И. И. и др.
44. Грушевский В. В.
45. Абрамов И. И. и др.
- Crimean Conf., September
46. Ореховская Т. И. и др.
- алов: сб. науч. тр. 2013. Т.
47. Утевский Л. М. Ди
48. Хирш П. и др. Эле
49. Кудрявцева Р. В. и др.
- электронов на кристалла
50. Аничик В. М., По
51. Hirsh D. J. et al. //
52. Li H. et al. // J. Mat
53. Krylova H., Hurski
2013. – 334 p.
54. Приезжев А. В. и др.
55. Cooper D. R. et al.
56. Morozov S. V., Nov
57. Grushevskaya H. V.
58. Krylova H. V. et al.
59. Keldysh L. V. // Let

A. S. EGOROV, V. P. EG
T. I. OREKHOVSKAYA,

ELECTROCHEMICA
ON DN

In this paper one of the states is developed. It is to adhesion via a change of op new complexes ssDNA wi (fWCNTs), which have few tion occurs in a process of compactification DNA wher and gel electrophoresis. Or bionanoheterostructure in nucleotide polymorphism a

медицина. 2012. Т. 10, № 4.

10.

899.

13243.

остояние и перспективы.

Минск, 24–26 апр. 2013 г.

ание и перспективы. Ма-

Applications and Properties.

Materials of 14th Int. Con-

а. 2013. Вып. 32. С. 94–100.

–4. С. 38–45.

–13.

1. Р. 121–137.

13, N 4. Р. 396–498.

– Режим доступа: www.

s & Optoelectronics. 2010.

ctual Property. 2013. Vol. 3

41. Grushevskaya H. V. et al. // J. Mod. Phys. 2013. Vol. 4. P. 7–17.
42. Kel'in A. V., Kulinkovich O. G. // Folia pharm. Univ. Carol. 1995. Vol. 18 (supplementum). P. 96–97.
43. Абрамов И. И. и др. // Петербургский журн. электроники. 2012. № 4(73). С. 59–67.
44. Грушевский В. В. и др. // Вестн. БГУ. Сер. 1: Физ. Мат. Информ. 2012. № 2. С. 23–28.
45. Абрамов И. И. и др. Microwave & Telecommunication Technology. Proceedings of 23rd Int. Crimean Conf., September 8–13, 2013, Sevastopol, Crimea, Ukraine; Moscow; Kiev, 2013. P. 851–852.
46. Ореховская Т. И. и др. // Современные методы и технологии создания и обработки материалов: сб. науч. тр. 2013. Т. 1. С. 216–223.
47. Утевский Л. М. Дифракционная электронная микроскопия в металловедении. М., 1973. – 584 с.
48. Хирш П. и др. Электронная микроскопия тонких кристаллов. М., 1968. – 574 с.
49. Кудрявцева Р. В., Павлов Д. А., Шиляев П. А. Геометрическая теория рассеяния ускоренных электронов на кристаллах. Н.Новгород, 2003. – 37 с.
50. Анищик В. М., Понарядов В. В., Углов В. В. Дифракционный анализ. Минск, 2002. – 185 с.
51. Hirsh D. J. et al. // Biophysical Journal. 1998. Vol. 75. P. 1858–1868.
52. Li H. et al. // J. Mater. Chem. 2011. Vol. 21. P. 824–828.
53. Krylova H., Hurski L. Spin polarization in strong correlated nanosystems. Saarbrücken, Germany. 2013. – 334 p.
54. Приезжев А. В. и др. Лазерная диагностика в биологии и медицине. М., 1989. – 240 с.
55. Cooper D. R. et al. // ISRN Condensed Matter Physics. 2012. Vol. 2012. ID 501686. 56 p.
56. Morozov S. V., Novoselov K. S., Geim A. K. // Physics – Uspekhi. 2008. Vol. 178. P. 776.
57. Grushevskaya H. V., Krylov G. // Nonlin. Phen. in Compl. Sys. 2014. Vol. 17, N 1. P. 86–96.
58. Krylova H. V. et al. // Nonlin. Phen. in Compl. Sys. 2010. Vol. 13, N 4. P. 334–351.
59. Keldysh L. V. // Letters to JETP. 1979. Vol. 29. P. 716.

A. S. EGOROV, V. P. EGOROVA, V. I. KROT, H. V. KRYLOVA, F. F. LAKHVICH, I. V. LIPNEVICH,
T. I. OREKHOVSKAYA, A. A. VELIGURA, M. I. GOVOROV, B. G. SHULITSKI, V. S. ULASHCHIK

ELECTROCHEMICAL AND ELECTROPHORETIC DETECTION OF HYBRIDIZATION ON DNA/CARBON NANOTUBES: SNP GENETIC TYPING

Summary

In this paper one of most topical approaches to analysis of biochemical DNA-containing marker states is developed. It is to detect conformational changes of single-stranded (ss) DNA state after marker adhesion via a change of optical, electro-chemical properties of layered nanobioheterostructures. To do it, new complexes ssDNA with chemically modified and non-covalent functionalized carbon nanotubes (fWCNTs), which have few walls, where synthesized under self-assembly conditions. The complexification occurs in a process of electron-dense compactification DNA on fWCNTs. Effects CNT-enhanced compactification DNA where discovered by Raman and dielectric spectroscopy methods, structural analysis, and gel electrophoresis. One proposes to utilize thin films from ssDNA/fWCNT complexes as sensitive bionanoheterostructure in capacitive sensors. The results using this new method for genetic typing of single nucleotide polymorphism are represented.